28 MN

Über das Saponin der Rhizome und Wurzeln der offizinellen Primula-Arten Primula veris und Primula elatior und seine chemische quantitative Bestimmung in Droge und Drogenzubereitungen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ludwig Klingmüller

aus Bremen

Hamburg
1961

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548107_0078

Über das Saponin der Rhizome und Wurzeln der offizinellen Primula-Arten Primula veris und Primula elatior und seine chemische quantitative Bestimmung in Droge und Drogenzubereitungen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ludwig Klingmüller
aus Bremen

Hamburg
1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Genehmigt von der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

auf Antrag von Professor Dr. F. Neuwald

Hamburg, den 7. 12. 60

Professor Dr. E. Otremba
Dekan

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Alle Rechte vorbehalten.

Als Manuskript vervielfältigt in der Fotostelle der Bibliothek des Instituts für Weltwirtschaft, Kiel

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit
wurden unter der Leitung von
Herrn Professor Dr. rer.techn. Fritz Neuwald,
soweit nicht anders vermerkt,
in den Laboratorien der Apotheke am Bleeck,
Bad Bramstedt/Holstein,
durchgeführt.

Meinem hochverehrten akademischen Lehrer,

Herrn Professor Dr. Fritz Neuwald,

der mir das Thema dieser Arbeit stellte, möchte ich für die während ihrer Durchführung gegebenen Anregungen und Ratschläge und für die mir dabei zuteil gewordene allgemeine Einführung in die Probleme der Galenischen Pharmazie aufrichtig danken.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung..... 1

Allgemeiner Teil

II. Über die Droge RADIX PRIMULAE Erg.B.6.

1. Historischer Rückblick und Aufnahme in Arzneibücher..... 3
2. Pharmakobotanische Betrachtung..... 5
3. Pharmakochemische Betrachtung..... 7
4. Qualitative und quantitative Methoden der Primulasaponin-Bestimmung..... 10
5. Wirkung und Anwendung..... 13

Experimenteller Teil

III. Gewinnung und Prüfung der Droge

1. Ernte, Trocknung und Verarbeitung des Ausgangsmaterials..... 17
2. Morphologische und histologische Untersuchungen..... 19
3. Asche-Bestimmungen..... 22
4. Bestimmung der hämolytischen Wirksamkeit... 24

IV. Darstellung, Eigenschaften und Prüfung des Primulasaponins

1. Isolierung. Verfahren zur Auffindung eines neutralen nativen Saponins. Ausbeuten..... 30
2. Eigenschaften des neutral gefällten und durch Säure gefällten Rohsaponins, des neutralen nativen und des sauren Primula-Reinsaponins..... 35
3. Schmelzpunkt-Tabelle..... 37
4. Kryoskopische Molekulargewichtsbestimmung.. 38
5. Titrimetrische Molekulargewichtsbestimmung. 39
6. Darstellung von Kaliumprimulat..... 40
7. Darstellung von Natriumprimulat..... 40
8. Spaltung des Primulasaponins..... 40
9. UV - Absorption..... 42
10. IR - Spektren..... 44

11. Hämolytische Wirksamkeit..... 47
12. Besprechung der Ergebnisse..... 50

Spezielle Untersuchungen

V. Chromatographische Untersuchungen des Primulasaponins, Primulagenins, der Primuladroge und Primulazubereitungen

1.a. Papierchromatographie..... 52
b. Detektion des Saponins und Genins mit Farbreagenz..... 52
c. Entwicklung der Chromatogramme..... 54
d. Detektion des Saponins mit Hämolyse..... 57
2.a. Dünnschichtchromatographie des Saponins und Genins..... 59
b. Entwicklung der Chromatogramme..... 59
c. Detektion des Saponins und Genins mit Farbreagenz..... 60
3. Diskussion..... 62

VI. Ein Farbtest zum qualitativen und quantitativen Nachweis des Primulasaponins

1.a. Reaktion mit Triterpenreagenzien..... 63
b. Neues Farbreagenz..... 66
2.a. Photometrische Bestimmung..... 68
b. Messung der Farblösung von neutralem nativem Primulasaponin im BECKMAN DU-Spektralphotometer. Eichkurve..... 69
c. Messung der Farblösung von neutralem nativem Primulasaponin im LEITZ-Kompensationsphotometer mit lichtelektrischer Anzeige. Standard-Eichkurve..... 71
d. Messung der Farblösung von saurem Primulasaponin im LEITZ-Kompensationsphotometer mit lichtelektrischer Anzeige. Eichkurve..... 74
3. Isolierung des Farbstoffs..... 76
4. Kolorimetrische Bestimmung des Primulasaponins in Droge und galenischen Zubereitungen..... 77

VII. Galenische Untersuchungen

1. Haltbarkeitsprüfungen von Primulasaponin in galenischen Zubereitungen..... 82

2. Herstellung eines Primula-Rohsaponins.... 84
3. Abänderungsvorschläge für die Herstellung von Primulazubereitungen unter Berücksichtigung eines standardisierten Primula-Rohsaponins..... 87

VIII. Zusammenfassung..... 88
IX. Häufig benutzte Präparate, Reagenzien und Lösungsmittel..... 92
X. Literaturverzeichnis..... 93

Lebenslauf

I. Einleitung

Die Zubereitungen und das Reinsaponin aus der Wurzeldroge der in Mitteleuropa heimischen Primulaceen Primula elatior (L.) SCHREBER und Primula veris L.em.HUDSON (= Primula officinalis (L.) HILL.) nehmen als klinisch-experimentell bewährtes Expectorans in verschiedenen europäischen Ländern im allgemeinen gegenüber den Zubereitungen aus überseeischen Drogen, wie Quillajarinde und Senegawurzel u.a., eine Vorrangstellung ein. Dies ist der Fall, obwohl an Hustenmittel, die galenische Primulazubereitungen darstellen, weder in qualitativer noch quantitativer Hinsicht irgendwelche Anforderungen gestellt werden.

Radix Primulae und Tinctura Primulae sind im Ergänzungsbuch zur 6. Ausgabe des Deutschen Arzneibuches, 1941, bereits aufgeführt. Wegen der Bedeutung der Droge sowohl für die pharmazeutische Praxis als auch für die pharmazeutische Industrie wurde Radix Primulae 1951 von dem Drogenausschuß der Arzneibuchkommission der DDR (HEEGER, 1951) und 1953 in der Bundesrepublik (LANG 1953, NEUWALD 1953, SEEL 1953) zur Aufnahme in das DAB 7 vorgeschlagen und eine standardisierte Droge gefordert.

In der Schweiz wurde 1948 Rhizoma Primulae in das Supplementum primum der Pharmacopoea Helvetica V aufgenommen und bereits ein qualitativer Saponinnachweis (Schaumtest) vorgeschrieben. 1955 wurde dann im Supplementum secundum die Monographie in der Weise geändert, daß ein Saponingehalt entsprechend einer bestimmten hämolytischen Wirksamkeit vorgeschrieben wurde. Ferner wurden drei galenische Primulazubereitungen in die Schweizerische Pharmakopöe aufgenommen.

Da biologische Wertbestimmungen, wie auch die Hämolysebestimmung, viele Fehlerquellen und große Fehlerbreiten aufweisen, erschien es im Hinblick auf ein DAB 7 und die pharmazeutische Praxis wünschenswert, den Versuch zu unter-

nehmen, einen chemischen oder physikalisch-chemischen Nachweis für den Wirkstoff der Primuladroge, das Primulasaponin, aufzufinden, der sowohl für die qualitative als auch für die quantitative Saponinbestimmung der Primuladroge und ihrer galenischen Zubereitungen geeignet ist.

Allgemeiner Teil

II. Über die Droge RADIX PRIMULAE Erg.B.6.

II. 1. Historischer Rückblick und Aufnahme in Arzneibücher

Der Name Primula wurde im 18. Jahrhundert aus dem Lateinischen entlehnt. Die "comici" Plautus und Terenz haben "primulum" als Verkleinerungsform von "primum" gebraucht. "Veris", der Genitiv von "ver", läßt in der Dichtersprache die "kleine Erste des Lenzes" entstehen (DEUTSCHES WÖRTERBUCH von J.u.W.GRIMM). Des Verbs "efferre", von dem "elatior" sich ableitet, bediente zum Beispiel Vergil sich bei einer Beschreibung der Palmen, "die in den Himmel emporragen" (HEINICHENS LATEINISCH-DEUTSCHES SCHULWÖRTERBUCH, 1931).
Die Schlüsselblume war und ist in Griechenland nicht heimisch. In Italien findet man im nördlichen Teil des Landes nur die montane Art (FLAMM, KROEBER u. SEEL, 1944), so daß die Tatsache nicht verwunderlich ist, daß die alten klassischen Autoren DIOSKURIDES und PLINIUS der Ältere, beide bis 79 n. Chr., die Primel nicht gekannt haben (JOACHIMOWITZ, 1920). Auf die erste Beschreibung der Schlüsselblume als in Deutschland heimischer Arzneipflanze trifft man in der PHYSIKA der Äbtissin HILDEGARD von Bingen, zwischen 1156 und 1168 (HUMMEL, 1957). In dieser Zeit gebrauchte man die Namen "himmelschluzela" und "hymelsloszel", die auf das Aussehen des Blütenstandes zurückzuführen sind, der einem Schlüsselbund und einem Schlüsselbart gleicht, mit dem man "im Frühjahr den Himmel aufschließen kann" (DEUTSCHES WÖRTERBUCH von J.u.W.GRIMM). Die Bezeichnung Schlüsselblume kam erst im 16.Jahrhundert auf. LEONHART FUCHS hat 1543 in seinem Kräuterbuch das Himmelschlüsselchen mit der Königskerze als identisch beschrieben, woraus die damals mitunter bestehenden Schwierigkei-

ten beim Bestimmen der Flora zu ersehen sind. Der Prager P.A.MATTHIOLUS gab 1563 dem Himmelschlüsselchen die Bezeichnung Primula veris, und er läßt wie alle seine Zeitgenossen das Kraut der Pflanze hauptsächlich gegen Gicht und Kopfweh anwenden (KROEBER, 1937), wie heute noch die Homöopathie. Im 18. Jahrhundert findet dann die Schlusselblume unter anderem in der MEDICO PHYSIKUM von WOYTS 1751 ihren festen Platz mit einer Unterscheidung der Wirkungen, die von dem Kraut und der Wurzel ausgehen. Die wässrigen und alkoholischen Auszüge von der Wurzel wurden gegen Zahnweh und Würmer verordnet; hauptsächlich wurden sie aber damals schon als Expectorans verwendet. Anfang des 19. Jahrhunderts geriet die Primel trotz der günstigen Erkenntnisse von HÜNEFELD, 1836 und 1839, als Arzneipflanze in Vergessenheit, als die einheimischen Drogen durch das Eindringen fremder, insbesondere tropischer Drogen wie Ipekakuanha, Quillaja und Senega verdrängt wurden. Im ersten Weltkrieg fiel die Einfuhr dieser wichtigen Expectorantien aus. 1920 erinnerte JOACHIMOWITZ an die "alte" Primelwurzel und führte sie wieder erfolgreich in die Arzneitherapie ein. WASICKY 1920, GAISBÖCK 1924 und KOFLER 1924 bezeichneten die Primelwurzel als vollwertigen Ersatz für die aus Nordamerika importierte Senegawurzel. v.LINGELSHEIM, 1927, sowie GILG, BRANDT und SCHÜRHOFF, 1927, waren allerdings der Meinung, daß für die Droge Radix Primulae lediglich Primula veris (= officinalis) in Frage käme, und sie sahen Primula elatior als Verfälschung an. Im Gegensatz dazu betrachtete KOFLER, 1928, die Elatiordroge entschieden nicht als Verfälschung und bezeichnete beide Primula-Arten als Stammpflanzen der Radix Primulae. Dementsprechend ist im Ergänzungsbuch zum DAB 6, 1941, unter Primelwurzel der getrocknete Wurzelstock mit den Wurzeln von Primula veris LINNE und Primula elatior SCHREBER vorgeschrieben.

Die Pharmakopöen der Schweiz, Tschechoslowakei, von Norwegen, Ungarn und Jugoslawien (SACAC, 1956) lassen für Radix bzw. Rhizoma Primulae ebenfalls die beiden Stamm-

pflanzen P.veris und P.elatior gelten, das Norwegische Arzneibuch (nach EXTRA PHARMACOPOEA XXIV 2., 1955) läßt außerdem noch P.vulgaris HUDSON (= P.acaulis L., HILL.), die schaftlose Schlüsselblume oder Erdprimel zu, was nach den Untersuchungen von KOFLER 1924, KOFLER und ADAM 1927 und SCHUMANN 1941 auch berechtigt ist.
In den übrigen neuzeitlichen Pharmakopöen von Dänemark 1948, Schweden 1946, Frankreich 1949, der Sowjetunion 1948 und in der Pharmakopöe der Vereinigten Staaten von Amerika 1960 und der von Großbritannien 1958 ist die Primelwurzel nicht aufgeführt.

II. 2. Pharmakobotanische Betrachtung

(Nach BÖHMIG 1954, ENGLER-PRANTL 1891, ERG.B.zum DAB VI 1941, FISCHER 1952, HEGI, JARETZKY 1949, KOMMENTAR zur PH.HELV. V SUPPL. I und II 1956, MEVIUS 1958, WASICKY 1929 und eigenen mikroskopischen Beobachtungen)

Die Gattung P r i m u l a umfaßt nach BÖHMIG, 1954, über 500 Arten. Sie steht nach dem ENGLERschen SYSTEM in der Ordnung Primuláles und in der Familie Primuláceae. Die in Europa weit verbreiteten Heilpflanzen der Untergattung Vernáles Prímula véris L.em.HUDSON (= P.officinális (L.) HILL. = P.odoráta GILIB.), die Frühlingsschlüsselblume, und Prímula elátior (L.) SCHREBER, die hohe Schlüsselblume, sind ausdauernde Stauden mit einer grundständigen Rosette von länglich-eiförmigen, unterseits behaarten, mehr oder weniger gerunzelten, am Rande wellig gezähnten, gestielten oder sitzenden Blättern und einem unbeblätterten Blütenschaft, der 30 cm hoch werden kann und eine 2 - 10blütige, nickende Dolde trägt. Die sympetalen Blüten sind fünfzählig. Der spaltige Kelch ist röhren- oder glockenförmig, er bleibt nach der Fruchtreife vertrocknet stehen. Der Kronensaum breitet sich in spaltigen Lappen aus. Die in einem Kreis angeordneten fünf Staubblätter sind am Schlund oder in der

Kronröhre befestigt; der kugelige oder eiförmige, oberständige Fruchtknoten trägt einen Griffel. Bei der Primula ist die Heterostylie stark ausgeprägt. Die Narben und Pollen sind zur gleichen Zeit reif, so daß die Insekten den Blütenstaub von der kurzgriffligen zur langgriffligen Blüte bringen und umgekehrt. Die Schlüsselblume ist ein Musterbeispiel für die kreuzweise Befruchtung, die nach DARWIN für eine heterostyle Blüte für die Entwicklung von nicht geschwächten Formen die Regel bilden muß.
Der braune, kurze und kräftige Wurzelstock zeigt eine warzig-höckerige Oberfläche, er steigt unter der Erde schräg an und ist allseitig dicht mit sekundären Wurzeln besetzt, die wie eine Mähne von dem Wurzelstock herabhängen. Die Primula-Arten veris und elatior sind leicht durch ihre Blüten und andere Merkmale zu unterscheiden.
Die schwefelgelbe Blütenkrone von P.elatior trägt einen zarten, dottergelben Ring am Schlund. Die Lappen des Kronsaums sind flach ausgebreitet, und der Kelch mit seinen scharf zugespitzten Zähnen ist an seinen Kanten betont grün gefärbt. Die Dolde ist zu einer Seite hingewendet. Der Boden muß für die den Schatten liebende P.elatior feucht sein; sie wächst gern auf Wiesen, an Bächen und im lichten Laubwald. Sie blüht im März bis April und ist im ganzen mittleren Europa anzutreffen.
Die wohlriechende Blütenkrone von P.veris ist dottergelb gefärbt und trägt fünf orangenfarbene Flecke am Schlund. Die Lappen des Kronsaums sind glockig-konkav zusammengeneigt, und der bleiche Kelch mit seinen kurz zugespitzten Zähnen ist bauchig erweitert und kantig. P.veris ist wie P.elatior über fast ganz Mitteleuropa verbreitet, sie braucht weniger Feuchtigkeit als die andere und liebt sonnige Wiesen und lichtes Gebüsch. Sie blüht durchschnittlich etwas später als P.elatior, im April bis Mai.

In getrocknetem Zustand ist das 3 - 6 cm lange Rhizom 3 - 5 mm und die durchschnittlich 10 cm langen Adventivwurzeln etwa 1 mm dick. Die Wurzeln von P.veris sind heller als die von P.elatior. Der Querschnitt des Rhizoms und der

Wurzel von beiden Arten zeigt eine dunkelbraune Epidermis. An jedem Schnitt sind Wurzelhaare zu sehen, die exogen angelegt sind und teils aus einer kurzen Stielzelle und einer birnenförmigen Endzelle bestehen, größtenteils aber mehrzellig sind. Die breite stärkehaltige Rinde besteht zum Teil aus stark knotig verdickten Parenchymzellen. Die aus einer Lage rechteckiger, kleinerer Zellen bestehende Endodermis ist mit sehr deutlichen CASPARYschen Streifen versehen. Sie umschließt zwei Gefäßbündelsysteme, die in zwei Kreisen angeordnet sind. Diese Erscheinung ist für ein Rhizom abnorm. Im äußeren Kreis sind die Gefäße zu sehen, welche die ausmündenden Adventivwurzeln versorgen und teilweise deshalb auch in der Rinde längs angeschnitten werden. Weiter innen liegt dann, durch Parenchymzellen getrennt, der zweite Gefäßkreis mit den auffallenden Gefäßen des Xylems. Das stärkefreie Mark des Rhizoms unterscheidet sich im Aufbau nicht wesentlich von der Rinde. Zahlreiche leuchtend gelbe Steinzellnester kennzeichnen das Mark des Rhizoms von P.elatior. Die Endodermis der Wurzel ist auch kleinzellig und umschließt den pentarchen bis heptarchen Zentralzylinder. Das Rindenparenchym der Wurzel und des Rhizoms enthält neben Stärke Inklusen, die sich mit Vanillin-Salzsäure rot färben.

II. 3. Pharmakochemische Betrachtung

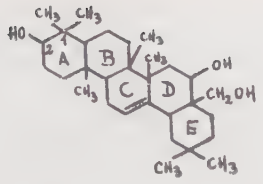
Von den bisher bekannten Inhaltsstoffen der Primelwurzel ist der pharmazeutisch interessanteste das Primulasaponin.

Primulasaponin.

Die Bezeichnung Saponine findet sich nach ROSENTHALER, 1905, erstmals in dem GMELINschen HANDBUCH DER THEORETISCHEN CHEMIE aus dem Jahre 1819. Als Saponine wurden früher die Naturstoffe bezeichnet, die bei Anwesenheit von Wasser starke Schaumbildung hervorrufen und als Fischgift verwendet werden können. Heute versteht man unter Saponinen stickstoffreie Glykoside, die sich wie Seifen

durch Oberflächenaktivität auszeichnen und die von KOBERT 1887 entdeckte hämolytische Wirksamkeit besitzen, die durch Cholesterinbindung des Saponins zum Teil oder gänzlich aufgehoben werden kann. Die Toxizität der Saponine, die Schaumbildung in wässriger Lösung und die hämolytische Wirksamkeit zeigen aber keine Parallelität und sind bei den verschiedenen Saponinen sehr unterschiedlich. Deshalb verlangten TSCHESCHE und HEESCH, 1952, eine genauere Fassung des Saponinbegriffs. Die Genine der Saponine können der Steroidreihe(z.B. Digitonin und Sarsasaponin) oder der Triterpenreihe (z.B. Aescin und Primulasaponin) angehören. Aufschluß über die Zugehörigkeit des Genins gibt die Selen-Dehydrierung nach O.DIELS. Sie läßt bei den Triterpenen 1,2,7-Trimethylnaphthalin (Sapotalin) und bei den Steroidverbindungen den DIELS-Kohlenwasserstoff, γ -Methylcyclopentenophenanthren,als Abbauprodukte entstehen. Der Säurecharakter eines Saponins kann im Aglykon (z.B. Zuckerrüben-, Calendula- und Guajaksaponin mit der Oleanolsäure als Aglykon) oder aber in einer Uronsäure des Zuckeranteils (z.B. bei Aescin und Primulasaponin) begründet sein.

Das Aglykon des Primulasaponins, das Primula-Genin A, hat ein Oleananskelett und wurde deshalb in die mannigfaltige Körperklasse der pentacyclischen Triterpene eingeordnet, deren Molekülaufbau mit konstant 30 Kohlenstoff-Atomen der Isoprenregel folgt (BISCHOF, JEGER und RUZICKA 1949, STEINER und HOLTZEM 1955).
MARGOT und REICHSTEIN, 1942, haben festgestellt, daß in dem Wurzelstock und in den Adventivwurzeln von Primula officinalis und P.elatior zumindest e i n gleiches Saponin vorliegt. Bis dahin waren die Meinungen darüber weit auseinandergegangen. Die genannten Autoren isolierten aus beiden Primula-Arten und aus gemischter Handelsdroge ein amorphes, saures Saponin über das kristalline Natriumsalz. MARGOT und REICHSTEIN, 1942, sind ferner der Meinung, daß außer diesem Hauptsaponin noch geringe Mengen Nebensaponine vorkommen, die sich nicht nur in der Zuckerkomponente, sondern auch im Aglykon unterscheiden dürften. Bei der



$\Delta^{12,13}$-2,16,28-trioxy-oleanen

Primulagenin A ($C_{30}H_{50}O_3$)

Hydrolyse des Primulasaponins wurde neben 1 Mol Glukose, 1 Mol Galaktose und 1 Mol Uronsäure, wahrscheinlich Glukuronsäure, ein neutrales Primulagenin A gefunden. Neuere papierchromatographische Untersuchungen von FINHOLT, 1957, ergaben nach der Hydrolyse des Natriumsalzes des Saponins als Zuckerkomponenten Rhamnose, Glukose, Galaktose und Galakturonsäure.

Die Vermutung von MARGOT und REICHSTEIN, 1942, daß dem Primulagenin A die Summenformel $C_{30}H_{50}O_3$ zukomme, wurde von BISCHOF und JEGER, 1948, die auch die Identität des Genins A aus Wurzeln der Primula officinalis und P.elatior bewiesen, und von BISCHOF, JEGER und RUZICKA, 1949, durch eine ausführliche Konstitutionsaufklärung bestätigt, wodurch auch die oben angegebene Strukturformel gesichert wurde.

Die Frage, ob das saure Primulasaponin, das unter anderen auch RUHKOPF und MOHS 1936, LINDNER, FIGALA und HAGER 1934 und KOFLER 1924 isolierten, der genuine Inhaltsstoff ist, blieb bisher ungeklärt. Die Aufbereitungen hatten nämlich den Nachteil, daß es unsicher blieb, wieweit durch das Kochen und Fällen mit Soda, durch das Fällen mit Säure, durch dialytische Verfahren oder durch häufiges Umfällen mit Lösungsmitteln wie Petroläther, Äther, Azeton oder Wasser Veränderungen des Saponinmoleküls hervorgetreten sind. Bei der Annahme von MARGOT und REICHSTEIN, 1942, daß in dem von ihnen aufgefundenen Saponin neben Primulagenin A sich in geringerer Menge noch ein Primulagenin B befinde, ist zu bedenken, daß ein gewisser Unterschied der beiden Substanzen möglicherweise nur durch Säureeinwirkung verursacht wurde.

Weitere Inhaltsstoffe.

Neben dem Primulagenin in glykosidischer Bindung kommen in den Wurzeln von P.veris und P.elatior offenbar keine Triterpenderivate vor. Es sind aber weitere, nicht saponinartige Glykoside, das Primverin und das isomere Primulaverin vorhanden. Primulaverin, das den nach Anis riechenden o-Methoxysalicylsäuremethylester abspaltet, findet sich vornehmlich in P.veris. Primverin, bei dessen Hydrolyse der nach Methylsalicylat riechende p-Methoxysalicylsäuremethylester entsteht, kommt hauptsächlich in P.elatior vor. Diese Ester bilden die Aglykone, die in der frischen Pflanze in jedem Fall an Primverose, 6-(β-D-Xylosido)-D-glukose gebunden sind. Die Spaltung der Glykoside setzt während eines längeren Trocknungsprozesses durch ein Ferment Primverosidase ein. Die Chemie dieser Spaltprodukte klärten GORIS und Mitarbeiter, 1913,1920,1921 auf. Als weitere Inhaltsstoffe der Droge werden wechselnde Mengen Gerbstoff, etwas ätherisches Öl, zu etwa 7 % Mineralstoffe (REICHERT, 1937) und in frischen Wurzeln zu etwa 0,5 % der Zuckeralkohol Volemit (α-Sedoheptit) mit einem Schmelzpunkt bei 155° C (ASAHINA, 1934) in der einschlägigen Literatur genannt.

II. 4. Qualitative und quantitative Methoden der Primulasaponin-Bestimmung

Die Anwesenheit von Primulasaponin und sein Gehalt ist für die Verwendung der Droge Radix Primulae und einer Primulazubereitung als Expectorans ohne Frage von wesentlicher Bedeutung. Zur Beurteilung der Droge finden sich in der Literatur sowohl qualitative als auch a n n ä h e r n d quantitative Methoden des Saponinnachweises, die jedoch alle für das Primulasaponin u n s p e z i f i s c h sind.

Qualitative Nachweise.

Für den qualitativen Nachweis von Primulasaponin in der Droge kommen die für wässrige Auszüge von Saponindrogen allgemein gültigen Methoden in Frage, so die Giftwirkung

im Tierversuch, die Hämolysewirkung - in blutisotonischen Verdünnungen, auf dem mit Blut getränkten Papierchromatogramm und nach dem Aufstreuen des angefeuchteten Drogenmaterials auf Blutgelatine - und das Schaumbildungsvermögen. Dieses benutzt beispielsweise die Ph.Helv.V-Suppl.I als Identitätsnachweis für Rhizoma Primulae. Danach wird 0,1 g Drogenpulver mit 5 ml kochendem Wasser im Reagenzglas übergossen, 15 Minuten stehen gelassen und nach dem Erkalten kräftig umgeschüttelt. Es soll eine starke Schaumschicht entstehen.

Quantitative Nachweise.
Die drei oben aufgeführten Nachweisverfahren können zu annähernd quantitativen Bestimmungen ausgewertet werden.

Die Oberflächenspannung einer Saponinlösung kann direkt durch Messung mit Hilfe des Stalagnometers, des Stagonometers, des Tensiometers oder eines Glockenmanometers festgestellt werden (Literatur bei STEINER und HOLTZEM, 1955, und GSTIRNER, 1955). Indirekt hingegen kann durch eine Bestimmung der Schaumzahl (Schaumindex) oder nach dem Schauminhibitionsverfahren der Gehalt einer Primulasaponinlösung festgestellt werden. Die Ph. Jugoslavica II nennt in den Monographien saponinhaltiger Drogen die Schaumzahl (HAGER 2. Erg.B., 1958). FINHOLT, 1959, hat eine Arbeitsweise für die Messung des Schaumbildungsvermögens von Primulasaponinlösungen beschrieben, die für den Apotheker leicht durchführbar ist.

Hämolysewirkung: Die Bestimmung der Wirksamkeit der Primuladroge und der daraus bereiteten galenischen Zubereitungen stellt nicht zuletzt durch die Vorschrift der Ph. Helv. V - Suppl. II - und des dazugehörigen Kommentars die beste Methode zur Wertbestimmung dar und hat dadurch große praktische Bedeutung erlangt. Die wesentlichen Faktoren dieses Verfahrens sind die Bereitung einer isotonischen Blutsuspension, einer isotonischen wässrigen Stammlösung von dem zu untersuchenden Material und einer Standard-Saponinlösung zum Vergleich beim Ansatz der Verdünnungs-

reihen. Der Saponin-Standard Ph.Helv.V ist ein aus dem Rhizom von Gypsophila paniculata gewonnenes, im Eidgenössischen Gesundheitsamt in Bern aufbewahrtes Reinsaponin. Es kann von dort in zugeschmolzenen Ampullen bezogen werden.
Die Ph.Bohemoslovenica II (zitiert nach HAGER 2.Erg.B., 1958) läßt den Saponingehalt von Radix Primulae nach einem eigenen Hämolyseverfahren mit Schlüsselblumensaponin als Standardsubstanz bestimmen. Dabei scheint es sich offenbar nicht um ein Reinsaponin zu handeln, weil das Standardsaponin gegenüber der Droge nur eine 4fache hämolytische Wirksamkeit haben soll und der durchschnittliche Saponingehalt der Droge nach den noch folgenden eigenen Untersuchungen bei 10 % liegt.
Dann hat noch FINHOLT, 1958, einen Beitrag durch die Bestimmung der Hämoglobinmenge geliefert, die aus den im Überschuß angebotenen Erythrozyten durch Hämolyse freigesetzt wird. Dabei wird sowohl das Oxyhämoglobin als auch das Methämoglobin quantitativ in Cyanmethämoglobin überführt und photometrisch bestimmt.

Zu den genannten quantitativen Verfahren muß allerdings gesagt werden, daß die hämolytische Aktivität und die Oberflächenspannung der Prüflösung durch die übrigen Inhaltsstoffe der Droge, die ebenfalls in den Prüflösungen anwesend sind, so z.B. Gerbstoffe und ätherisches Öl, beeinflußt werden können. Hinzukommt, daß für die Primulasaponin-Bestimmung der Ph.Helv. V ein Gypsophilasaponin verwendet wird. Es dürfte erstrebenswert sein, für jede Saponindroge das aus dieser Droge isolierte Saponin oder einen Drogenstandard als Testsubstanz zu verwenden, wie es die Csl. II für die Primula-Wertbestimmung vorsieht. Wenn man dann diese Testsubstanz mit einem internationalen Saponin-Standard hämolytisch, nach RUNGE, 1952 und 1953, mit konserviertem Blutstandard, vergleicht, ist es möglich, unter Berücksichtigung einer Fehlerbreite von $\pm$ 10 % mehr oder weniger brauchbare Ergebnisse zu erhalten. Nebenbei sei erwähnt, daß die Beschaffung einwandfreien Blutes

leicht Schwierigkeiten bereiten kann und daß vom Einstellen und Austeilen bis zum Ablesen der Hämolyse-Verdünnungsreihen mindestens 36 Stunden vergehen.

Bestimmung der Giftwirkung im Tierversuch: KARMA und v.SCHANTZ, 1959, haben eine Bestimmung des relativen Saponingehalts von verschiedenen Primuladrogen-Mustern mit dem Xenopus-Verfahren ausgearbeitet. Es wurden 2 - 4 Wochen alte Larven von Xenopus laevis, dem afrikanischen Krallenfrosch, verwendet, für die zunächst die toxische Grenzkonzentration eines Drogenauszuges aufgesucht wurde. Dieser Grenzwert wurde daraufhin mit einer Lösung des Primulasaponins verglichen.

Um einen spezifischen qualitativen Nachweis zu ermöglichen, sollte ein für den papier- und dünnschichtchromatographischen Nachweis geeignetes Reagenz gesucht werden, mit dem das Primulasaponin sich in Drogenpulvern und galenischen Primulazubereitungen identifizieren läßt.
Ferner erschien es notwendig, zu versuchen, eine chemische Saponinbestimmung auszuarbeiten, die möglichst das Genin im Primulasaponin anspricht.

II. 5. Wirkung und Anwendung

Das der Droge Radix Primulae eigene Saponin ruft eine expectorierende Wirkung hervor. Nach unterschwelligen peroralen Gaben von 1 - 10 mg Primulasaponin verstärkt sich die Sekretion der Schleimhäute der Atemwege. JOACHIMOWITZ 1920, GRIMME 1921, GAISBÖCK 1924, RUNDSHAGEN 1934 u.a. haben diese für das Primulasaponin charakteristische Eigenschaft klinisch-experimentell aufgezeigt, nachdem HÜNEFELD, 1836, schon auf die günstige Wirkung des "Kratzstoffes" der Primelwurzel bei chronischen Phlegmasien der Lungenschleimhaut hingewiesen hatte. Das Ammoniumsalz des Saponins wurde von CZERWONKA, 1929, als gutes Expectorans

beschrieben. HÜNEFELD 1836 u. 1839, HENDERSON und TAYLOR 1910 und VOLLMER 1934 erkannten, daß die Atemwege von der Magenschleimhaut aus reflektorisch zur vermehrten Sekretbildung angeregt werden. Gelangt jedoch eine größere Menge Saponin (etwa ab 0,5 g) in den Magen, so stellen sich durch den verstärkten Reiz auf die Magenschleimhaut Übelkeit und Erbrechen ein. KOFLER, KOLLERT, GRILL und SUSANI, 1925 u. 1926, zeigten im Tierversuch, daß bei übermäßigen Gaben der hundertste Teil des Saponins in die Blutbahn gelangen kann, um dann in der Leber, der Niere (als Folge einer starken Hämoglobin-Ausscheidung) und vom Rückenmark aus toxische Erscheinungen hervorzurufen. Im Sputum vom Menschen wurde das Primulasaponin nach peroraler Verabreichung therapeutisch vertretbarer Mengen nicht angetroffen. Nach JARETZKY, 1949, soll das Elatiorsaponin stärker hämolysieren als das Verissaponin und das Elatiorsaponin nach intravenöser Gabe beim Kaninchen in erster Linie ein Lebergift und das Verissaponin ausschließlich für die Niere schädlich sein. Nach den zuvor genannten Autoren trat beim Kaninchen nach intravenöser Zufuhr relativ großer Mengen von Primulasaponin für 8 - 12 Tage ein erhöhter Cholesterinspiegel im Serum auf. Dabei wurden Gewichtsstürze bis zu 100 g beobachtet, die zumindest teilweise durch Wasserentziehung erklärt wurden. Als kurzfristige Todesursache bei oralen oder parenteralen Überdosierungen wird der durch die Zerstörung großer Erythrozytenmengen akut auftretende Sauerstoffmangel im Bereich aller lebenswichtigen Zentren angesehen. Das Primulasaponin soll aber, in kleiner Menge verabreicht, von der intakten Magen- und Darmwand nicht resorbiert werden (MØLLER, 1953), so daß es normalerweise niemals zu einer intravitalen Hämolyse kommen kann. Dazu tragen im Dünndarm unter anderem die Enzyme des Pankreassaftes und im Dickdarm die Darmbakterien durch einen Abbau des Saponins bei. Deshalb ist bei der Verabreichung von Primulasaponin nur dann Vorsicht geboten, wenn der Patient Wunden im Darm, Magen oder Rachen aufweist, weil dann dem ungespaltenen Saponinmolekül leicht die Gelegenheit gegeben wird, in die Blutbahn zu gelangen.

Viele Fragen über die therapeutischen Eigenschaften der weiteren Inhaltsstoffe der offizinellen Primelwurzel sind noch offen. Neben der expectorierenden Wirkung wird ein d i u r e t i s c h e r Effekt diskutiert, der von HERRE, 1937, und von HILDEBRANDT, 1936, mit dem des Theobromins verglichen wird. Es konnte jedoch nicht aufgeklärt werden, ob das Saponin, Spaltprodukte desselben oder die anderen in der Wurzel anwesenden Glykoside bzw. das ätherische Öl für die Diuresewirkung verantwortlich zu machen sind. Nach GAISBOCK, 1924, kann die Harnausscheidung am ersten Behandlungstag einmalig auf das Zweifache erhöht werden. Bei der Zusammenstellung einer Arznei muß man außerdem beachten, daß das Saponin die Resorption aus dem Magen-Darmtrakt ganz allgemein erhöht.
In der Volksheilkunde spielt die Primelwurzel bei der Behandlung von Migräne und Rheuma und als Diureticum heute nur noch eine untergeordnete Rolle. Die von der ganzen frischen Pflanze bereiteten Tinkturen werden in der Homöopathie bei Migräne und Nierenleiden angewandt (SCHINDLER, 1955). Für das Wirkungsbild sind wahrscheinlich die Salicylsaureester der Glykoside Primverin und Primulaverin mitverantwortlich.

A n w e n d u n g findet die Primuladroge nur selten in Teemischungen, meist in Form von galenischen Zubereitungen als Hustenmittel insbesondere bei trockenem Husten auf Grund seiner sekretolytischen Wirkung. Das Erg.B.6. führt eine Tinctura Primulae auf, die aus 2 Teilen grob gepulverter Schlüsselblumenwurzel und 10 Teilen verdünntem Weingeist durch Mazeration bereitet wird. Praktisch spielt jedoch diese Tinktur in deutschen Apotheken kaum noch eine Rolle, seitdem ein zusammengesetzter Fluidextrakt der Droge, das Stadatrat Primulae compositum als STADA-Präparat (Standardpräparat Deutscher Apotheken) eingeführt wurde. Dieser Fluidextrakt wird aus

	Radix Primulae conc.	200 g,
	Fructus Foeniculi	40 g,
	Liquor Ammonii caustici	30 g,
	Glycerin	36 g,
	Spiritus	662 g,
und	Aqua dest.	412 g bereitet.

Wie schon in der Einleitung erwähnt wurde, ist dieser Fluidextrakt in keiner weise standardisiert. Im Suppl.II der Ph.Helv.V ist ein standardisierter Trockenextrakt zu finden, aus dem ein ebenfalls offizineller Fluidextrakt frisch zu bereiten ist.

Experimenteller Teil

III. Gewinnung und Prüfung der Droge

III. 1. Ernte, Trocknung und Verarbeitung des Ausgangsmaterials

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit standen zwei Muster der Handelsdroge Radix Primulae Erg.B.6., A und B, zur Verfügung. Da es sich bei dieser Droge allgemein um botanisch nicht einwandfrei bestimmtes Material unbekannten Alters handelt, wurde außerdem Primelwurzel aus Anbau und wildwachsenden Beständen im Frühjahr 1959 geerntet. Auf diese Weise stand einwandfrei bestimmtes, frisches Material zur Verfügung. Die angebauten Primulastauden stammten aus einer Veris-Kultur vom Versuchsfeld Wulfsdorf des Staatsinstituts für Angewandte Botanik, Hamburg.[+)] Die nach und nach aufblühenden Schlüsselblumen wurden bestimmt und mit kleinen bunten Holzstäben markiert. Neben P r i m u l a v e r i s befanden sich verschiedene Abarten; es wurden jedoch nur die Pflanzen ausgewählt, die allen unter II.2. aufgeführten Anforderungen entsprachen. Das waren eigenartigerweise in der überwiegenden Zahl Pflanzen mit kurzgriffliger Blüte. Als die Blüte Mitte April ihren Höhepunkt erreicht hatte, wurde etwa 10 % der Kultur ausgegraben. Die Wurzeln wurden durch festes Schlagen gegen den Spaten von der anhaftenden Erde zum größten Teil befreit und mit einem Messer von den ober-

[+)] Dem derzeitigen Direktor des Staatsinstituts für Angewandte Botanik, Hamburg, Herrn Prof.Dr.K.Egle und dem Abteilungsvorsteher, Herrn Dr.K.Garber möchte ich für die freundliche Überlassung der Veris-Kultur herzlich danken.

irdischen Teilen der Pflanze getrennt.
Ein ausreichender Bestand von wildwachsender P r i m u l a e l a t i o r wurde ebenfalls im April desselben Jahres in einem feuchten, lichten Laubwald gefunden (Standort: an der Autobahn Hamburg-Lübeck, 2 km vor der Abzweigung Bargteheide, rechtsseitig von Hamburg). Dieser für sich abgeschlossene Bestand enthielt ausnahmslos Primula elatior. Die Heterostylie war im Verhältnis 1:1 ausgeprägt. Neben der Bestimmung der Blütenform wurden in mehreren Stichproben stets Steinzellnester in dem Rhizom gefunden. Die Pflanzen wurden wie oben präpariert und in Körben eingebracht, wobei darauf geachtet wurde, daß das Material nicht "zum Schwitzen" kam.
Alle Wurzeln wurden innerhalb von zwei Tagen Stück für Stück mit einer harten Bürste unter fließendem kaltem Leitungswasser gesäubert und von grünen Sproßteilen und zum Teil auch von den für die Saponingewinnung unnützen feinen Wurzelhaaren befreit. Das Material wurde nach der Wäsche 1/4 Stunde zwischen Filtrierpapier gelegt. Insgesamt standen etwa 5 kg Elatior- und 10 kg Veriswurzeln zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung. Sie enthielten durchschnittlich 80 % Feuchtigkeit.

Die äußerlich abgetrockneten Wurzeln wurden locker auf eine durchlöcherte Aluminiumplatte geschüttet und im warmen Luftstrom unter mehrmaligem Umwenden vorgetrocknet. Danach wurden die Wurzeln auf einem luftigen Dachboden auf Zeitungspapier in einer dünnen Schicht ausgebreitet, um dann täglich mit der Hand gewendet und gelockert zu werden. Auf diese Weise wurde bei allen Chargen eine Schimmelbildung verhindert. Nach einem Monat wurde das Drogenmaterial in weiten, offenen Blechkanistern durch einen warmen Luftstrom (Temperatur nicht über 30° C) 1 Stunde nachgetrocknet. Ein Rhizom samt anhängenden Wurzeln wog etwa 1 - 2 g.

Dann wurde der Behälter fest verschlossen und noch am gleichen Tag auf den Boden des Staatsinstituts für Angewandte Botanik, Hamburg, gebracht. Dort wurden die Rhizome

und Wurzeln fein pulverisiert (Sieb IV), wobei Stück für Stück, zum Teil vorher mit der Hand zerkleinert, in eine Schlagkreuzmühle gegeben wurde. Dabei wurde darauf geachtet, daß der Mahlgang nicht verstopfte und daß das Drogenmaterial nicht zu stark erhitzt wurde. Während des mehrstündigen Mahlvorgangs bot ein dichtes Tuch vor Mund und Nase gegen den sehr feinen Staub keinen vollen Schutz. Der Drogenstaub reizte die Lidränder und Schleimhäute von Mund und Nase, was zunächst starken Feuchtigkeitsfluß und Schwellung der Schleimhäute, dann starke Trockenheit und Durstgefühl hervorrief, Nach ein paar Stunden waren jedoch alle unangenehmen Erscheinungen wieder völlig ohne Nebenwirkungen abgeklungen.

Insgesamt wurden etwa 1 kg Elatior- und 2 kg Verisdroge pulverisiert. Das Drogenpulver wurde in Leinensäckchen gefüllt, die an der Ausmündung der Drogenmühle befestigt worden waren. Die gefüllten Beutel wurden vor Feuchtigkeit geschützt aufbewahrt.

III. 2. Morphologische und histologische Untersuchungen

Die selbst geernteten Wurzeln und Rhizome von Primula veris und P.elatior und die aus dem Handel bezogenen Drogenmuster A und B wurden morphologisch und histologisch nach den unter II.2. ausgeführten Beschreibungen der Droge Radix Primulae des Erg.B.6. untersucht. Dabei wurden Schnitte von Wurzeln und Rhizomen der verschiedenen Provenienz nebeneinander unter dem Mikroskop verglichen.
Die morphologischen und histologischen Untersuchungen zeigten, daß das Ausgangsmaterial der Primuladroge den Anforderungen des Erg.B.6. und der unter II.2. aufgeführten einschlägigen Literatur entsprach.

Außerdem wurde versucht, für das Primulasaponin einen lokalisierenden Nachweis zu erbringen.
Es wurden Pflanzenschnitte auf einem Objektträger mit ver-

schiedenen Triterpenreagenzien (siehe VI.1.a.) benetzt. Dabei erwiesen sich die allgemein üblichen Triterpen-Farbreaktionen als wenig brauchbar, weil,wie STEINER und HOLTZEM, 1955, schon festgestellt haben, durch konzentrierte Säuren das Zellgewebe zerstört wird und die dabei auftretende Dunkelfärbung die spezifische Farbreaktion verdeckt wird. Gute Resultate hingegen wurden mit der von BRIESKORN und BRINER, 1953, für den histochemischen Triterpennachweis empfohlenen Chlorsulfonsäure erzielt. Die Schnitte von frisch geernteten Rhizomen und Wurzeln wurden mit Chloralhydratlösung aufgehellt, zwischen Filtrierpapier gut getrocknet und mit einem Tropfen Chlorsulfonsäure-Reagenz versetzt.
Zusammensetzung des Reagenzes: Chlorsulfonsäure und Sesolvan NK $^{(R)}$ werden im Verhältnis 7 : 3 vorsichtig gemischt. Die so angefärbten Schnitte wurden im Mikroskop betrachtet und zwei als Beispiele der erzielten Färbung photographiert.

Die folgenden Abbildungen (80fache Vergrößerungen) wurden mit dem Mikrophotoaufsatz zur Leica in einem ZEISS-Mikroskop aufgenommen.
Das Objektiv des Mikroskops hatte eine 8fache Eigenvergrößerung. Als Lichtquelle diente eine horizontal auf den Spiegel gerichtete 25-Watt-Lampe mit Blauglas. Der Photoaufsatz war mit einem LEITZ-Perplan-Okular mit 10facher Eigenvergrößerung und zwei Auslöserkabeln für Zeit- und Blendenverschluß versehen. Ein Beobachtungsgang ermöglichte die Scharfeinstellung des Bildes. Die Kamerablende konnte auch zwischen den Aufnahmen geöffnet bleiben. Die AGFA-Negativfilme wurden jeweils 1 Sekunde belichtet.

Die Farbaufnahme der Abbildung 1 zeigt einen Rhizomquerschnitt von Primula elatior. Das dunkelrot gefärbte Saponin erscheint in den Gefäßen beider Xyleme und diffus verteilt in ihrer Umgebung. Durch das Reagenz werden im Mark und in der Rinde auch die Zellen rot angefärbt, die Inklusen enthalten. Damit Verwechslungen ausgeschaltet werden, ist es erforderlich, daß man den Schnitt mit dem Reagenz ganz kurz erwärmt. Danach zeigen die triterpenhaltigen Zellen eine ins Violett gehende Färbung, während die Zellen, die Inklusen haben, eine bräunliche Färbung annehmen. Es wurde an den Wurzeln- und Rhizomquerschnitten ferner beobachtet, daß Triterpenkörper in geringerer Menge im ganzen

Zentralzylinder und von innen her auch in der Rinde verteilt sind. Sie fehlen aber immer dort, wo zum äußeren Rand der Rinde hin der Stärkegehalt zunimmt. Schließlich kommt eine triterpenhaltige Substanz in nicht unerheblicher Menge in der Epidermis und ihrer nächsten Umgebung vor. In den Wurzelhaaren wurde kein Triterpenkörper angetroffen.

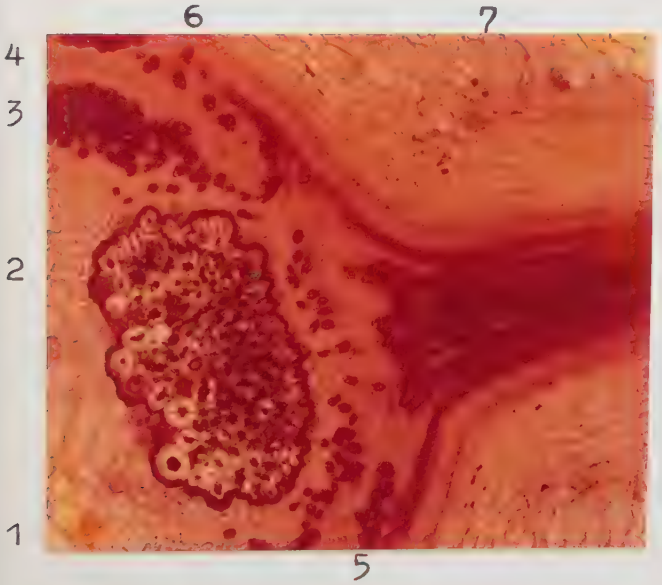


Abbildung 1.
1.) Mark mit Inklusen, 2.) Steinzellnester, 3.) Xylem des normalen, inneren Gefäßbündelkreises, 4.) Phloem und Parenchymschicht, 5)) abnormes Gefäßbündelsystem (Xylem und Phloem), 6.) Endodermis mit CASPARYschen Streifen, 7.) Rinde mit Inklusen.

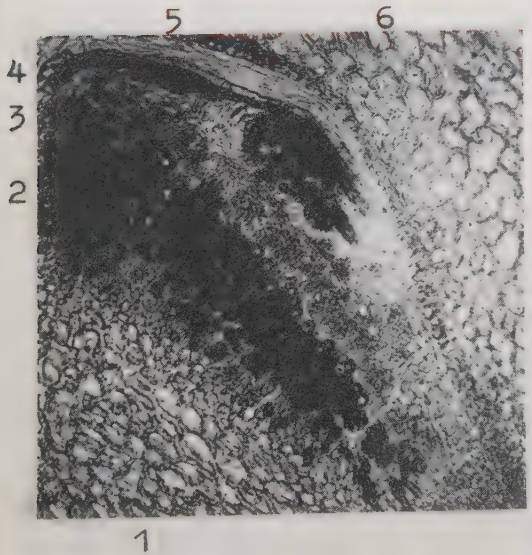


Abbildung 2.
1.) Mark, 2.) Xylem des normalen, inneren Gefäßbündelkreises, 3.) Phloem und Parenchymschicht, 4.) abnormes Gefäßbündelsystem (Xylem und Phloem), 5.) Endodermis mit CASPARYschen Streifen, 6.) Rinde. Die Schwarz-Weiß-Aufnahme dieser Abbildung zeigt einen Querschnitt durch das Rhizom von Primula veris. Das dunkelrot gefärbte Saponin erscheint hier, in gleicher Weise lokalisiert, schwarz.

Vergleichsweise wurden auch Längsschnitte und halbierte Querschnitte von frisch geernteten Rhizomen und Wurzeln mit Blutgelatine nach FISCHER, 1952, präpariert.

3,5 g weiße gepulverte Gelatine wurde bei 60° C in 100 ml 8,5%iger Natriumchlorid-Lösung gelöst. Die in der Kälte erstarrende Gelatinelösung wurde im Eisschrank aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde jeweils 5 g der durch leichtes Erwärmen wieder verflüssigten Gelatine mit 10 Tropfen Zitratblut(vom Rind) versetzt.

Die mit der Blutgelatinesuspension beträufelten Schnitte wurden schnell auf dem Objektträger mit einem Deckglas blasenfrei abgedeckt und in das Gefrierfach des Eisschranks gelegt. Sofort nach dem Erstarren der Gelatine wurden die Schnitte unter dem Mikroskop betrachtet. Eine Hämolyse wurde in allen die Wurzeln und Rhizome begrenzenden Schichten beobachtet. Eine Hämolyse trat ebenfalls in der Umgebung des Rindenparenchyms auf, wobei die Intensität zu den Rändern hin nachließ. Besonders stark war die Hämolyse an den Stellen, wo sich angeschnittene Gefäße befanden. Das Markgewebe zeigte keine Hämolyse.

Die Ergebnisse dieser histologischen Untersuchungen sind insofern interessant, als die heute bestehenden Anschauungen über die Art und Weise, wie die Triterpenkörper entstehen und wie die Pflanze diese in ihrem physiologischen Haushalt einsetzt, fast nur hypothetischer Natur sind. Es konnte hier nachgewiesen werden, daß sich das Saponin fast ausschließlich in den Gefäßen des Rhizoms und der Wurzeln befindet.

III. 3. Asche-Bestimmungen.

Die selbst geernteten und die aus dem Handel bezogenen Drogen wurden nach dem Nachweis ihrer Identität auch hinsichtlich der Qualität nach den Bestimmungen des Erg.B.6. geprüft. Der Artikel Radix Primulae enthält neben der morphologischen und histologischen Beschreibung der Droge

nur eine Aussage über ihren widerlich kratzenden Geschmack und eine, daß die Droge glykosid- und saponinhaltig sei, und eine Forderung, daß die Asche nicht mehr als 10 % betragen darf. Diese Forderung ist jedoch nur als Reinheitsprüfung zu betrachten.
Es wurde zunächst eine Asche-Bestimmung entsprechend der "Bestimmung der Asche in Drogen" in HAGERS HANDBUCH DER PHARMAZEUTISCHEN PRAXIS, 2.Erg.B., 1958, bzw. den Vorschriften der Pharmacopoea Danica, 1948, durchgeführt.

Die Droge wurde zunächst 2 Stunden im Trockenschrank bei 105° C unter wiederholtem Umwenden getrocknet. Dann wurde jeweils etwa 2,5 g Drogenpulver (Sieb V DAB 6.) in einer auf Gewichtskonstanz gebrachten Porzellanfritte 1A2 auf der analytischen Waage genau eingewogen. Die Droge wurde zunächst vor der Glutzone an der Öffnung eines elektrischen Muffelofens (1000 Watt Energieaufnahme) vorsichtig verkohlt und dann eine Stunde lang in den geschlossenen Muffelofen gestellt. Es zeigte sich, daß die nach Ablauf dieser Zeit erhaltene Asche Gewichtskonstanz erreicht hat.

Gemäß den neueren Arzneibüchern, insbesondere der Ph.Dan. 48, wurde zusätzlich eine Bestimmung der in 2n-Salzsäure unlöslichen Asche und eine Bestimmung der wasserlöslichen Asche durchgeführt. Beide Bestimmungen gehen von der Gesamtasche aus.

Bei der Bestimmung II der folgenden Tabelle wurde die Gesamtasche 10 Minuten mit 25 ml Wasser gekocht und der unlösliche Rest mit 50 ml kochendem Wasser ausgewaschen und ebenso wie die Gesamtasche bis zur Rotglut erhitzt. Den Anteil der wasserlöslichen Asche erhält man aus der Differenz zwischen dem Gewicht der Gesamtasche und dem Gewicht der wasserunlöslichen Asche.

Bei der Bestimmung III wurde die Gesamtasche 10 Minuten mit 25 ml 2n-Salzsäure gekocht und der ungelöste Rest mit heißem Wasser ausgewaschen und bis zur schwachen Rotglut erhitzt.

Tabelle der Asche-Bestimmungen.

Droge (Sieb V)	I Gesamtasche	II Wasserlösliche Asche in %	III Salzsäureunlösliche Asche in %
Primula veris	7,1	3,0	1,8
Primula elatior	6,7	2,9	1,5
Handelsdroge A, als Rad.Primulae Erg.B.6. pulv. gross. bezeichn.	23,6	0,6	12,6
Handelsdroge B, als Rad.Primulae Erg.B.6. conc. bezeichnet. Abgesiebt	5,2	0,8	1,7
		Fehlergrenze etwa ± 10 %	

Die selbst gesammelten Primelwurzeln und die aus dem Handel bezogene geschnittene Droge entsprachen der Bestimmung des Erg.B.6., während die pulverisierte Handelsdroge durch ihren hohen Aschegehalt auffiel, der im wesentlichen auf Sand zurückzuführen ist, wie aus der Bestimmung der salzsaureunlöslichen Asche hervorgeht. Über die Forderung des Erg.B.6. (Höchstbetrag von 10 % Gesamtasche) hinaus sollte auch ein Höchstgehalt an salzsäureunlöslicher Asche vorgeschrieben werden, der auf 3 % begrenzt werden könnte.

III. 4. Bestimmung der hämolytischen Wirksamkeit

Neben der Bestimmung des Aschegehalts hatte das Supplementum primum, 1948, zum Schweizer Arzneibuch, 1933, die Primuladroge durch einen Nachweis ihres Schaumbildungsvermögens zusätzlich qualitativ auf Primulasaponin prüfen lassen.

Das Supplementum secundum, 1955, hat außerdem die Prüfung auf die hämolytische Wirksamkeit eingeführt, mit der das Primulasaponin annähernd quantitativ bestimmt werden soll.

Für Rhizoma Primulae wird ein Saponingehalt gefordert, der einer hämolytischen Wirksamkeit von mindestens 10 Ph.-Helv.-E. im g entspricht.

1 Ph.-Helv.-Einheit bedeutet die hämolytische Wirksamkeit von 1 cg des Saponin-Standards Ph.Helv.V (ein auf diese hämolytische Wirksamkeit eingestelltes Gypsophilasaponin, siehe II.4.).

Ausführung der Hämolysebestimmung nach Ph.Helv.V - Suppl.II

Bereitung der Stammlösung. 0,20 g Schlüsselblumenwurzel (Sieb V DAB 6.) wird in einem Erlenmeyerkolben von 100 ml Inhalt mit genau 50 ml eines Gemisches von 50 Teilen Weingeist und 50 Teilen Wasser während einer halben Stunde unter gelegentlichem Umschwenken am Rückflußkühler auf dem Wasserbad erhitzt. Dann wird erkalten gelassen. 10 ml der durch wenig Watte filtrierten Flüssigkeit (genau gemessen) werden in einer weiten, flachen Schale bei höchstens 80° C zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit Pufferlösung vom pH ungefähr 7,4 aufgenommen und im Meßkolben mit dieser Pufferlösung auf 50 ml verdünnt. Die erhaltene Lösung dient als Stammlösung zur Bestimmung der hämolytischen Wirksamkeit.

Im Vor- und im Hauptversuch ist die gleiche Erythrozytensuspension zu verwenden. Alle Volumina sind genau zu messen.

Vorversuch. In 3 Reagenzgläsern werden folgende Mischungen hergestellt:

Konzentration		I	II	III
Stammlösung	ml	0,25	0,50	1,00
Pufferlösung	ml	0,75	0,50	----
Erythrozytensuspension	ml	1,00	1,00	1,00

Die Mischungen werden sofort nach der Herstellung unter Vermeiden von Schaumbildung leicht umgeschwenkt. Nach 1/4 Stunde wird erneut umgeschwenkt und dann 6 Stunden stehen gelassen. Nach dieser Zeit wird festgestellt, bei welcher Konzentration Totalhämolyse eingetreten ist, d.h. eine klare, rote Lösung ohne Erythrozytensediment entstanden ist. Wenn diese Mischungen nicht völlig klar oder nicht rein rot werden, so ist für die Beurteilung allein das Verschwinden des Erythrozytensediments maßgebend.

Die Stammlösung kann direkt für den Hauptversuch verwendet werden, wenn einzig die Konzentration III Totalhämolyse zeigt. Sie muß mit Pufferlösung auf das doppelte Volumen verdünnt werden, wenn in den Gläsern II und III Totalhämolyse eingetreten ist, und muß doppelt so konzentriert hergestellt werden, falls keine der 3 Konzentrationen Totalhämolyse aufweist.

Hauptversuch. Mit der auf Grund des Vorversuches als geeignet befundenen Lösung, im folgenden Prüflösung genant, wird die nachstehend aufgeführte (arithmetische) Verdünnungsreihe angesetzt.

Konzentration Nr.	Prüflösung ml	Pufferlösung ml	Erythrozyten-suspension ml
40	0,40	0,60	1,00
45	0,45	0,55	1,00
50	0,50	0,50	1,00
55	0,55	0,45	1,00
60	0,60	0,40	1,00
65	0,65	0,35	1,00
70	0,70	0,30	1,00
75	0,75	0,25	1,00
80	0,80	0,20	1,00
85	0,85	0,15	1,00
90	0,90	0,10	1,00
95	0,95	0,05	1,00
100	1,00	----	1,00

Das Mischen und die Beurteilung erfolgen wie im Vorversuch, die Beurteilung jedoch erst nach 24 Stunden.

In genau gleicher Weise wird eine Verdünnungsreihe geprüft, in der anstelle der Prüflösung Saponin-Standardlösung verwendet wird; dabei sind jedoch nur die Konzentrationen Nrn. 60 - 100 anzusetzen.

Hämolytische Wirksamkeit = $\frac{a \cdot c}{b \cdot d}$ Ph.-Helv.-E. im g.

a = Nummer der geringsten totalhämolysierenden Konzentration der Standardlösung.
b= Nr. der geringsten totalhäm.Konzentr. der Prüflösung.
c = Gehaltsfaktor der Saponin-Standardlösung.
d = Menge Droge bzw. Präparat in g, die 100 ml der Prüflösung entspricht.

Reagenzien.

Erythrozytensuspension. Eine Glasstöpselflasche von 250 ml Inhalt wurde zu 1/10 ihres Volumens mit einer 3,65%igen Natriumzitratlösung versetzt und 20 Minuten im Autoklaven bei 120° C im gesättigten Wasserdampf sterilisiert. Danach wurde die Flasche unter Umschwenken langsam mit Rinderblut gefüllt, das unmittelbar nach der Schlachtung noch körperwarm durch sterilisierten Mull der Zitratlösung hinzugeseiht wurde. Anschließend wurde das Blut-Zitrat-Gemisch gut durchgeschüttelt und für höchstens 8 Tage zur Aufbewahrung in den Kühlschrank gestellt. Frühestens nach 6 Stunden wurde 1 ml von diesem Gemisch (Vollpipette) im Meßkolben mit Pufferlösung auf 50 ml verdünnt. Diese Suspension wurde höchstens für 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt.

Pufferlösung. Bei der Wahl der Pufferlösung wurde die von RUNGE, 1952 u. 1955, vorgeschlagene gepufferte Natriumchloridlösung der reinen Phosphat-Pufferlösung des Suppl. II zur Ph.Helv.V vorgezogen. RUNGE fand zwar bei der Hämolysebestimmung von Radix Primulae keinen Unterschied, ob der nach BÜCHI und DOLDER, 1950, bereitete Trockenrückstand des Drogenauszuges mit reiner Phosphatpufferlösung nach BUTZ, 1945, oder mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung aufgenommen wurde. Nach eigenen vergleichenden Voruntersuchungen stellte sich allerdings heraus, daß die mit gepufferter, isotonischer Kochsalzlösung angesetzten Versuchsreihen sich wesentlich besser ablesen ließen, als die mit reiner Phosphat-Pufferlösung bereiteten. Es traten nämlich bei den kritischen Grenzkonzentrationen hinsichtlich der quantitativen Beurteilung des Sediments klarere Verhältnisse auf.

Blutisotonische phosphatgepufferte Natriumchlorid-Lösung:

$Na_2HPO_4 + 2\ H_2O$	nach SØRENSEN	3,95 g
KH_2PO_4	nach SØRENSEN	0,76 g
NaCl		7,20 g
Aqua dest.		ad 1000,0 ml
		pH 7,4 (Glaselektrode).

Saponin-Standardlösung. Ca. 0,01 g Saponin-Standard Ph. Helv.V (genau gewogen) wird im Meßkolben in Pufferlösung zu 100 ml gelöst. Als Gehaltsfaktor gilt das Gewicht des zu 100 ml gelösten Saponin-Standards in cg.
Die Lösung wurde nicht länger als 7 Tage im Eisschrank bei + 4° C aufbewahrt.

Ergebnisse.
Von den zur Verfügung stehenden Mustern wurden nur die selbst geernteten Primelwurzeln und die Handelsdroge B untersucht, weil der Aschegehalt der Handelsdroge A zu hoch war.

Als Nummer (a) der geringsten totalhämolysierenden Konzentration der Standardlösung, die einen Gehaltsfaktor (c) von 1,0 hatte, wurde 85 festgestellt. 0,08 (d) g Droge entsprach jeweils 100 ml Prüflösung.

Handelsdroge B, Radix Primulae Erg.B.6.
b = 80. Hämolytische Wirksamkeit = 13,3 Ph.-Helv.-E. im g.

Primula veris, selbst geerntet.
b = 90. Hämolytische Wirksamkeit = 11,8 Ph.-Helv.-E. im g.

Primula elatior, selbst geerntet.
b = 70. Hämolytische Wirksamkeit = 15,2 Ph.-Helv.-E. im g.

Methodisch bedingte Fehlerbreite = ± 10 %

Die Hämolyse-Bestimmungen zeigen, daß die selbst geernteten Rhizome und Wurzeln von Primula veris und P.elatior sowie die untersuchte Handelsdroge B der Forderung des Suppl.II zur Ph.Helv.V hinsichtlich der Wirksamkeit entsprechen. Interessant ist, daß die Handelsdroge B, die nach eigener Prüfung aus Elatior- und Verisdroge bestand, eine hämolytische Wirksamkeit aufweist, die annähernd dem Mittelwert der hämolytischen Wirksamkeit der selbst geernteten Veris- und Elatiorwurzeln entspricht.

Zum Vergleich seien die Werte aufgeführt, die TOMCZYK, 1957, mit polnischer Droge erzielt hat.

Primula veris	11,2 - 12,0 Ph.-Helv.-E. im g
Primula elatior	10,9 - 13,3 Ph.-Helv.-E. im g

Berechnung des hämolytischen Indizes.
Abweichend von der Bestimmung der hämolytischen Wirksamkeit, ausgedrückt in Einheiten, die sich auf eine bestimmte

Gewichtsmenge eines Standardsaponins beziehen, wie es für Arzneibuchvorschriften zweckmäßig ist, wird bei wissenschaftlichen Untersuchungen im allgemeinen die Wirksamkeit als "Hämolytischer Index" (H.I. oder h.I.) ausgedrückt. BÜCHI, HIPPENMEYER und DOLDER, 1950, haben diesen hämolytischen Index folgendermaßen definiert:

Der hämolytische Index ist die Anzahl ml Blutkörperchen-Aufschwemmung (2 ml Rinderblut + 98 ml Pufferlösung), die von 1 g einer saponinhaltigen Droge oder eines Drogenpräparates vollständig hämolysiert wird. Zur Ausschaltung der unterschiedlichen Resistenz verschiedener Blutsorten wird auf ein Standard-Saponin (H.I. = 25000) bezogen.

Diese Definition wird heute allgemein anerkannt.

Die Berechnung des hämolytischen Indizes erfolgte entsprechend den Ausführungen von STEINER und HOLTZEM, 1955, in der Weise, daß, wie auch im Hauptversuch nach der Vorschrift der Ph.Helv.V beschrieben, in den Verdünnungsreihen der Prüflösungen und der Saponin-Standardlösung die entsprechende totalhämolysierende Menge Standardsaponin (a) bzw. Droge (b) ermittelt und daraus nach folgender Formel der hämolytische Index berechnet wurde.

$$\text{Hämolytischer Index} = S \cdot \frac{a}{b}$$

S = Hämolytischer Index des Standard-Saponins (25000),
a = Gewichtsmenge des Standard-Saponins, das 1 ml Blutkörperchenaufschwemmung eben noch völlig hämolysiert,
b = Gewichtsmenge der Droge oder des Drogenpräparates, das 1ml Blutkörperchenaufschwemmung eben noch völlig hämolysiert

Für die untersuchten Drogen ergeben sich, auf diese Weise berechnet, folgende hämolytische Indizes:

Handelsdroge B	3320
Primula veris	2950
Primula elatior	3775

Methodisch bedingte Fehlerbreite = ± 10% (siehe unter IV.11.)

Zum Vergleich sei auf der folgenden Seite eine Tabelle mit Hämolysewerten von Radix Primulae aus der Literatur (BÜCHI und DOLDER, 1950) aufgeführt.

			H.I.	
WOJAHN		min.	3000	
FISCHER		ca.	3000	
KOFLER und ADAM			3200	
TOMINGAS			3100	
SCHUMANN			2950	
SCHUMANN	P.veris		2900	(2200–4675)
	P.elatior		3210	(1800–4000)
WÜRTZEN			5440	
KOFLER	P.veris		14500	
	P.elatior		9900	
ENGI	P.veris		1000–5000	
	P.elatior		1300–3000	

BÜCHI und DOLDER, 1950, fanden unter bestimmten Bedingungen bei der Herstellung des Drogenauszuges (40% Äthanol) einen H.I. von 2850 und schlugen vor, daß für das Suppl. II zur Ph.Helv.V der H.I. von Rhizoma Primulae mindestens 2700 betragen sollte.

IV. Darstellung, Eigenschaften und Prüfung des Primulasaponins

IV. 1. Isolierung

Zur Ausarbeitung der zum Ziel gesetzten chemischen Gehaltsbestimmung für das Primulasaponin mußte zunächst eine größere Menge reiner Substanz hergestellt werden.

Die Darstellungsverfahren für Primulasaponin gleichen einander sehr. Die erfolgreichsten Arbeiten wurden von RUHKOPF und MOHS, 1936, und von MARGOT und REICHSTEIN, 1942, durchgeführt. Die letzteren extrahierten die pulverisierte Droge mit wässrigem Ammoniak. Das Filtrat wurde mit Salzsäure kongosauer gemacht und der Niederschlag abzentrifugiert. Das noch feuchte Rohsaponin wurde wieder in wässrigem Ammoniak gelöst und durch Kochen mit Sodalösung nach einiger Zeit das Natriumsalz des Primulasaponins kristallisiert erhalten. Durch Zusatz von Essigsäure und Wasser zu einer methanolischen Lösung des Natriumsalzes, die anschließend eingeengt wurde, erhielt man ein amorphes, saures Saponin. RUHKOPF und MOHS, 1936,

fällten das Saponin in einfacher Weise aus dem wässrig-ammoniakalischen Drogenauszug mit Salzsäure im Überschuß und reinigten das Rohsaponin über das Ammoniumsalz. Vor diesen beiden Veröffentlichungen liegen, soweit sich feststellen ließ, neun Publikationen, deren Ergebnisse sich teilweise sehr widersprechen (HÜNEFELD 1836 u. 1839, ENGFELDT 1921, KOBERT 1912, KOFLER 1924, LINDNER 1934, MASSON 1911, MUTSCHLER 1877, ULZER u. HAAS 1942 und YANAGISAWA 1926). KOFLER, 1924, fällte das Rohsaponin aus einem alkoholischen Drogenextrakt nach dem Abdestillieren des Alkohols bis auf etwa 1/3 des Ausgangsvolumens durch anschließenden Zusatz von Wasser und weiteres Einengen bis zum Verschwinden des restlichen Alkohols. Die weitere Reinigung erfolgte mit Hilfe der Elektrodialyse und ergab ein saures Saponin mit einem Schmelzpunkt von 218° - 220° C unter Zersetzung. LINDNER, 1934, extrahierte ebenfalls Primelwurzeln mit 70%igem Alkohol und gewann durch Eindampfen und Zusatz von Wasser zwei Saponine: ein kristallisiertes, in Alkohol schwer lösliches und ein amorphes, in Alkohol leichter lösliches Saponin. Die Ausbeuten an kristallisiertem und amorphem Saponin schwankten bei verschiedenen Drogenmustern. Eine Erklärung für das Auftreten der beiden Saponine nebeneinander und ihre Löslichkeitsunterschiede war LINDNER nicht möglich. Leider wurden von KOFLER und von LINDNER auch keine Angaben über das Alter der von ihnen verwendeten Ausgangsdrogen gemacht. Interessant ist nämlich, daß ENGFELDT, 1921, festgestellt hat, daß der Gehalt der Droge an "Saponinsäure" unbedeutend sei (LINDNER, 1934), während alle anderen Autoren zu dem Schluß gekommen sind, daß der wirksame Hauptbestandteil der Droge, das Saponin, saure Natur besitze.

Die Schwierigkeit bei der Reindarstellung des Primulasaponins beruhte auf der Beseitigung organischer und anorganischer Begleitstoffe. Energische Eingriffe verändern sehr leicht die Struktur des Saponins. Daher wurde als notwendig angesehen, mit neutralen Lösungsmitteln zu arbeiten, um das Primulasaponin möglichst in nativer Form

zu erfassen.
Wie später noch ausgeführt wird, hatten Vorversuche mit einem von der Fa. Beiersdorf & Co., Hamburg, freundlicherweise zur Verfügung gestellten Primula-Rohsaponin die Möglichkeit der Entwicklung eines papierchromatographischen Nachweises von Primulasaponin ergeben. Ich möchte mich an dieser Stelle für die Überlassung des Rohsaponins bedanken. Die Isolierungsversuche konnten daher chromatographisch kontrolliert werden.

Zunächst wurde versucht, das Rohsaponin allein mit Wasser aus der Droge zu extrahieren, weil in der Therapie Dekokte und Infuse von Primelwurzel verwendet werden und deshalb mit einer gewissen Wasserlöslichkeit des Rohsaponins zu rechnen war. Diese Versuche wurden aber gleich wieder abgebrochen, weil durch den hohen Stärkegehalt der Droge eine starke Quellung eintrat und das Saponin aus dem schleimigen Auszug im neutralen Medium zu schwer zu erfassen war.

Nach weiteren Vorversuchen erwiesen sich eine Vorextrahierung mit Aethylmethylketon, das BOEDECKER, 1954, bei der Herstellung von Kastanien-Rohsaponin in einem anderen Darstellungsverfahren angewandt hat, und eine Saponinextraktion mit Methanol als sehr geeignet. Für den Extraktionsgang wurde jeweils von etwa 50 g Droge ausgegangen, um vergleichbare Ergebnisse der Ausbeuten zu bekommen.

Extraktionsgang.
1.) Etwa 50 g fein pulverisierte Droge (Sieb IV) wurde im Soxhlet auf dem Wasserbad mit etwa 250 ml Aethylmethylketon erschöpfend extrahiert. Saponin konnte in diesem dunkelgrün-braunen Auszug papierchromatographisch nicht nachgewiesen werden.
Es fiel jedoch in dem Auszug eine reduzierende Substanz aus, die sich in Wasser sehr leicht löste, mit Vanillin-Salzsäure (1,19) eine Rotfärbung und mit Eisenchloridlösung eine dunkle Violettfärbung ergab. Diese Substanz hatte auf dem Papierchromatogramm bei Verwendung des Fließmittels

Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2 v/v/v) einen Rf-Wert von 0,40 (Papier S.&S. 2043bMgl, 5 1/2 Stunden). Nach einem Bad in vanillin- und antimonIIIchloridhaltigem Chloroform zeigte sich noch nach über 14 Tagen ein brauner Fleck. Von der Identifizierung dieser Substanz wurde abgesehen. Das Aethylmethylketon wurde durch Destillation zurückgewonnen. Der Rückstand wurde verworfen.

2.) Die Extraktionshülse wurde mit ihrem Inhalt bei 90° C getrocknet und als nächstes Lösungsmittel Methanol (etwa 250 ml) verwendet. Die Temperatur des Lösungsmittels betrug in der Umgebung der Extraktionshülse 40° - 45° C. Im Kolben fiel während der Extraktion bereits Rohsaponin aus. Dadurch kam es leicht zu stärkerem Stoßen, das aber durch eine heizbare Magnetrühranlage+) verhindert werden konnte. Nach erschöpfender Extraktion (etwa 8 Stunden) wurde das Methanol-Saponin-Gemisch auf 100 ml eingeengt; dabei fiel ein weiterer Teil des Saponins aus, bedingt durch die sich ändernden Konzentrationsverhältnisse. Bereits KOFLER und LINDNER hatten beim Einengen von wässrig-äthanolischen Auszügen das Ausfallen von Rohsaponin beobachtet. Dann wurde das Rohsaponin auf der Nutsche scharf von dem Methanol getrennt, mit etwas 90%igem Alkohol (etwa 3 ml) gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

3.) Der abgetrennten Mutterlauge, die sich durch den Waschalkohol getrübt hatte, wurden zur Lösung des Niederschlags 60 ml Methanol und 40 ml Wasser hinzugesetzt. Das nunmehr blanke Filtrat (Mutterlauge) wurde auf dem Wasserbad in einer Destillationsapparatur eingeengt. Nachdem 100 ml Lösungsmittel abdestilliert war, wurde die danach übergehende Flüssigkeit tropfenweise durch Wasser ergänzt. Die Destillation wurde solange fortgesetzt, bis 40 ml Destillat durch Wasser ersetzt war. Dabei fiel wiederum Saponin in kristalliner Form aus. Anschließend wurde das Gemisch

+)Hersteller: JAHNKE & KUHNKE KG, Typenbezeichnung RAH/C.

12 Stunden im Kühlschrank stehen gelassen.
5.) Das von der neutralen Fällung herrührende Saponin wurde scharf abgesaugt oder abzentrifugiert[+]. Die dabei anfallende Mutterlauge wurde zur späteren Aufarbeitung beiseite gestellt.
6.) Das vereinigte, aus Methanol bzw. wässrigem Methanol neutral gefällte Saponin wurde mit 5 - 10 ml Wasser aufgerührt und abzentrifugiert. Dann wurde der noch feuchte Rückstand im Verhältnis 1:100 in Methanol gelöst und mit Tierkohle entfärbt. Das geschah am besten durch kräftiges Schütteln der auf nur 30° C erwärmten Kohlesuspension vor dem Filtrieren.
7.) Das Filtrat wurde zur Trockne eingedampft und das Saponin mit einer möglichst geringen Menge 50%igem Methanol umkristallisiert. Dabei fiel eine schneeweiße Substanz an, deren Schmelzpunkt sich durch weiteres Umkristallisieren aus 90%igem Alkohol schließlich bei 275° C konstant erhalten ließ. Dieses neutral gefällte Saponin wird als neutrales natives Primulasaponin bezeichnet. Es wurde im Trockenschrank bei 105° C getrocknet und im Vakuumexsikkator über Kieselgel (Blaugel) aufbewahrt. Die papier- und dünnschichtchromatographischen Untersuchungen, auf die später noch ausführlich eingegangen wird, ergaben die Einheitlichkeit des isolierten Saponins.

Aufarbeitung der Mutterlaugen.
Die von den Saponinfällungen abgetrennten Mutterlaugen und die Kristallisationsmutterlaugen wurden vereinigt und vom Methanol und Alkohol weitgehend befreit. Dabei entstand eine Trübung. Durch Zusatz von wenigen Tropfen 25%iger Salzsäure wurde die trübe Lösung kongosauer gemacht. Beim Ansäuern fiel ein gelartiger Niederschlag aus, der nach Zusatz von ein paar Tropfen Essigsäure (zur Erleichterung der Sedimentation) abzentrifugiert wurde. Der im

[+]Eine Zentrifuge Modell ROTOFIX 2800 wurde mir freundlicherweise durch Vermittlung von Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Oelschläger vom Institut für Pharmazeutische Chemie, Hamburg, zur Verfügung gestellt, wofür ich mich an dieser Stelle noch einmal bestens bedanken möchte.

sauren Medium erhaltene Niederschlag wurde als Primulasäure identifiziert und im Gegensatz zum neutralen nativen Primulasaponin als saures Primulasaponin bezeichnet. Die weitere Reinigung erfolgte wie unter Ziff. 6 und 7. Der Schmelzpunkt dieses sauren, auch farblosen Saponins lag bei 220° C (nach schnellem Erhitzen). Es wurde ebenfalls im Vakuumexsikkator über Kieselgel (Blaugel) aufbewahrt.

Nach diesem Isolierungsgang wurden mit den zur Verfügung stehenden Drogen folgende Ausbeuten erzielt:

Neutrales natives Verissaponin	= etwa 2 %
Neutrales natives Elatiorsaponin	= etwa 1 %
Neutrales natives Saponin (neutral gefällt nach Ziff.1-7) aus Handelsdroge B	= bis 0,3 %
Saures Verissaponin	= etwa 1 %
Saures Elatiorsaponin	= etwa 2 %
Saures Saponin (aus den Mutterlaugen durch Säure gefällt) aus Handelsdroge B	= etwa 3 %

IV. 2. Eigenschaften des neutral gefällten und durch Säure gefällten Rohsaponins, des neutralen nativen und des sauren Primula-Reinsaponins

1.) Das neutral gefällte Rohsaponin aus der frischen Droge ist in Wasser klar löslich. Aus älterer Handelsdroge konnte nur sehr wenig neutrales Saponin isoliert werden. Eine wässrige Lösung ergab auf Zusatz von Salzsäure einen amorphen, gelartigen Niederschlag, der sich mit der Primulasäure der Literatur als identisch erwies. Es wurde daher vermutet, daß das durch neutrale Fällung gewonnene native Rohsaponin salzartig gebundene Primulasäure darstellt. Zur Aufklärung dieser Frage wurden 4 g neutrales natives Veris- bzw. Elatior-Rohsaponin in etwa nach dem von WINKLER und PATT, 1960, für die Gewinnung von Aescin beschriebenen Verfahren mit 7 g Kationenaustauscher I

MERCK in 150 ml 50%igem Methanol 15 Minuten lang mit dem Magnetrührer ausgerührt. Das Austauschharz wurde anschließend mit einer Glasfritte abgefangen und in ein einseitig mit Watte und einem Hahn verschlossenes Glasrohr gefüllt und solange mit entmineralisiertem Wasser gewaschen (etwa 100 ml), bis der Abdampfrückstand des Eluats mit Schwefelsäure nicht mehr gefärbt wurde. Anschließend wurde mit 50 ml n/10-Salzsäure eluiert. Das Eluat wurde eingedampft und der kristalline Rückstand auf Anwesenheit von Kationen geprüft. Die Kalignost-Reaktion fiel positiv aus,und das Flammenspektrum zeigte eine deutliche Kaliumbande.

2.) Das mit Säure gefällte Rohsaponin bildete leicht ein Gel, es war außerordentlich hygroskopisch.

3.) Das neutrale native Reinsaponin besteht aus farblosen feinkristallinen Körnern oder Plättchen mit einem Schmelzpunkt von 270° - 275° C. Es ist wie das neutral gefällte Rohsaponin in Wasser klar löslich, eine 0,05%ige wässrige Lösung hat ein pH von 7,9 (Glaselektrode, 20° C). Bis zur Erreichung eines pH von 7,0 wurde durchschnittlich 0,27 ml 1/100n-Salzsäure verbraucht. Nach Erreichung eines pH-Wertes von 5,9 zeigte die Lösung einen stark gepufferten Charakter. Das native Reinsaponin ist in Methanol und in 90%igem Alkohol wesentlich schlechter löslich als in Wasser.

4.) Das saure Reinsaponin konnte nur in amorphem Zustand gewonnen werden. Schmp. 220° - 225° C bei schnellem Erhitzen. Es ist in Methanol und in 90%igem Alkohol leichter löslich als das neutral gefällte Reinsaponin. Das saure Saponin hat einen stark hygroskopischen Charakter. Es bildet bei Gegenwart von Wasser ein Gel. Es wurde im Einklang mit den Untersuchungen von LINDNER, 1934, festgestellt, daß das saure Saponin Feuchtigkeit kolloidchemisch so zäh festhalten kann, daß selbst nach längerem Trocknen der Substanz bei 105° C eine weitere Gewichtsabnahme auftritt. Ohne Erreichung der Gewichtskonstanz verfärbt sich die Substanz unter Zersetzung gelblich und schließlich bräunlich. Die bei 105° C nur kurz getrocknete Substanz nahm im Exsikkator über Kalziumchlorid nach 12 Stunden noch erheblich an

Gewicht wieder zu. Es wurde deshalb darauf verzichtet, den analytischen, insbesondere den noch folgenden photometrischen Ergebnissen, die mit dem sauren Primulasaponin erzielt wurden, eine wesentliche Bedeutung beizumessen.

IV. 3. Schmelzpunkt-Tabelle

Primulasaponin	Eigene Isolierung	MARGOT u. REICHSTEIN (1942)	RUHKOPF u. MOHS (1936)
	°C	°C	°C
elatior, neutral nativ	270-275	------	------
elatior, sauer	225-230	etwa 240	------
veris, neutral nativ	273-275	------	------
veris, sauer	215-220	235-237	------
Handelsdroge B, neutral	270-275	------	------
Handelsdroge B, sauer	220-230	230-240	220
Kaliumprimulat, aus saurem Verissaponin	249-250	------	251
Natriumprimulat, aus saurem Verissaponin	etwa 280	283-285	------
Natriumprimulat, aus saurem Elatiorsaponin	------	280-281	------

Das Primulasaponin schmilzt bei den angegebenen Temperaturen unter Zersetzung. Die Diskrepanz zwischen den Schmelzpunkten des sauren Elatior- und Verissaponins

dürfte auf die Instabilität dieser sauren Saponine zurückzurführen sein. Die Schmelzpunktbestimmungen der Saponine eigener Isolierung wurden im LEITZ-Heiztischmikroskop durchgeführt. Die aufgeführten Schmelzpunkte der sauren Saponine ließen sich nur durch schnelles Erhitzen erhalten.

IV. 4. Kryoskopische Molekulargewichtsbestimmung[+)]

Primulasaponin, in neutraler nativer oder saurer Form, ist in Campher sehr gut löslich. Die Lösung von Saponin in Campher hat einen niedrigeren Dampfdruck als reiner Campher; das hat eine Gefrierpunktserniedrigung zur Folge.

Die Verschiebung der Fixpunkte ($\Delta t_g = t_g - t'_g$) ist bei gegebenem Lösungsmittelvolumen der in diesem Volumen gelösten Mohlzahl des gelösten Stoffes proportional (RAOULTsches Gesetz). Daraus läßt sich für die kryoskopische Molekulargewichtsbestimmung folgende Gleichung ableiten:

$$M = K \cdot \frac{g \cdot 1000}{L \cdot \Delta t_g}$$

K = molare Gefrierpunktserniedrigung des Lösungsmittels (Campher)

g = gelöste Substanz in g

L = Lösungsmittel in g

Δt_g = Gefrierpunktserniedrigung in C° .

Verissaponin, neutral nativ.

0,649 mg Substanz mit 6,763 mg Campher gemischt ergab eine Depression von 3,3° C; als Konstante K der molaren Gefrierpunktserniedrigung des Camphers wurde 40 ermittelt.

Mol.-Gew. 1163

Fehlerbreite = ± 10 %

[+)] Die kryoskopischen Molekulargewichtsbestimmungen wurden durch die freundliche Vermittlung des Instituts für Pharmaz. Chemie der Universität Hamburg von dem Mikroanalytischen Laboratorium Dr.F.Pascher, Bonn, durchgeführt. Herrn Priv.-Doz.Dr.H.Oelschläger möcnte ich auch an dieser Stelle für seine Unterstützung ganz herzlich danken.

Primulasaponin, sauer, aus Handelsdroge (vorwiegend elatior).
0,703 mg Sbst., 7,806 mg Campher, K = 40; Schmp.-Depr.3,9°C.

Mol.-Gew. 924

Fehlerbreite = ± 10 %

Nach MARGOT und REICHSTEIN, 1942, läßt sich für das saure Primulasaponin das Molekulargewicht wie folgt berechnen:

$C_{30}H_{50}O_3 + C_6H_{10}O_7 + 2\ C_6H_{12}O_6 - 3\ H_2O = 959{,}10.$

IV. 5. Titrimetrische Molekulargewichtsbestimmung

Es wurde das saure Primulasaponin als einbasische Carbonsäure titriert.

Natives Verissaponin wurde, wie unter IV.2. beschrieben, mit Kationenaustauscher ausgerührt. Das dabei ausfallende Saponin wurde abzentrifugiert und bei auf 100° C ansteigender Temperatur vorsichtig getrocknet. Nach 12 Stunden Trocknung im Vakuumexsikkator über Kieselgel (Blaugel) wurde ein Schmelzpunkt von 220° C erhalten. Trotz aller aufgeführten negativen morphologischen Eigenschaften des sauren Primulasaponins wurde jeweils 500 mg Substanz in 10,0 ml 0,100n-Natronlauge und 3 Tropfen 1%iger alkoholischer Phenolphthaleinlösung mit dem Magnetrührer gelöst. Anschließend wurde bei 18° C mit 0,100n-Salzsäure bis zum Farbumschlag zurücktitriert.
Verbrauch: 5,15 5,10 5,05 ml 0,100n-Natronlauge.

Mol.-Gew. etwa 970-990

Vergleichswerte aus der Literatur.

LINDNER, 1934. Verissaponin, mit Elektrodialyse gereinigt, F = 220° C, Titr.mit Kalilauge gegen Phenolphthalein. Mol.-Gew. 1055-1116.
RUHKOPF und MOHS, 1936. Saures Primulasaponin, hauptsächlich elatior, Titr. mit alkoholischer Kalilauge. Mol-Gew. 1170-1180.
MARGOT und REICHSTEIN, 1942. Saures Primulasaponin aus Handelsdroge, Titr. mit Kalilauge gegen Phenolphthalein. Mol.-Gew. 870.

Abschließend muß gesagt werden, daß die Ergebnisse der kryoskopischen und titrimetrischen Molekulargewichtsbestimmungen keine neue Schlußfolgerung über das Molekulargewicht von Primulasaponin zuließen.

IV. 6. Darstellung von Kaliumprimulat

Kaliumprimulat wurde erhalten durch Kochen einer methanolischen Lösung von saurem Veris-Reinsaponin mit alkoholischer Kalilauge. In Annäherung an die Ergebnisse von RUHKOPF und MOHS, 1936, wurde ein außerordentlich gut wasserlösliches Produkt mit einem Schmelzpunkt von 249°- 250° C gefunden.

IV. 7. Darstellung von Natriumprimulat

Natriumprimulat wurde nach dem Verfahren von MARGOT und REICHSTEIN, 1942, dargestellt. 2 g saures Verissaponin wurde in sehr verdünntem wäßrigem Ammoniak gelöst, die Lösung filtriert, zum Sieden erwärmt und in der Hitze tropfenweise mit etwa 2 ml 2n-Sodalösung versetzt. Nach längerem Kochen im offenen Kolben begann das Natriumsalz in feinen Nädelchen auszukristallisieren. Die Kristalle wurden nach der Abkühlung abgenutscht, mit wenig Wasser gewaschen und bei 105° C schnell getrocknet. Schmp. etwa 280° C.

IV. 8. Spaltung des Primulasaponins

Die hydrolytische Spaltung des Saponins (nach RUHKOPF u. MOHS, 1936, und MARGOT u. REICHSTEIN, 1942) wurde vorgenommen, um feststellen zu können, ob die zum Ziel gesetzte Farbreaktion das Genin, den Zuckeranteil oder beide Teile des Saponins in gleicher Weise anspricht.

Je 50 g pulverisierte Veris- und Elatiordroge wurde getrennt nach IV.1. extrahiert. Aus beiden methanolischen Extrakten wurden nacheinander die durch neutrale und saure Fällung

gewonnenen Rohsaponine unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft. Der jeweilige Rückstand wurde nach RUHKOPF und MOHS, 1936, mit 10 ml 33%iger Schwefelsäure und 30 ml 90%igem Alkohol 7 Stunden am Rückflußkühler unter Sieden hydrolysiert. Anschließend wurde der Alkohol abdestilliert und die restliche Suspension in Wasser gegossen. Die dabei auftretende Fällung wurde nach 2 Stunden abgenutscht, in Methanol aufgenommen und die Lösung dann durch n/2-alkohol.Kalilauge schwach alkalisiert. Die Mischung wurde 1/2 Stunde am Rückflußkühler im Wasserbad erhitzt, nach dem Erkalten mit Salzsäure neutralisiert, filtriert und vorsichtig eingedampft. Der Eindampfrückstand wurde mit 75 ml Äther aufgenommen und die ätherische Lösung 2mal mit je 15 ml 4%iger Natronlauge und 3mal mit je 15 ml Wasser gewaschen.
Die farblose Lösung wurde bei vermindertem Druck eingedampft und der getrocknete Rückstand (Rohgenin) nach MARGOT und REICHSTEIN, 1942, mit Benzol umkristallisiert. Danach wurde das Rohgenin, in möglichst wenig Äther gelöst, auf eine Aluminiumoxyd-Säule gegeben, die mit Benzol eingeschlämmt worden war (Säule: 6 g Aluminiumoxyd alkalifrei WOELM, Höhe 7 cm, Durchmesser 1 cm). Zunächst wurde mit 200 ml Benzol eluiert. Anschließend wurde 200 ml Äther nach und nach auf die Säule gegeben. Beide Elutionsmittel lieferten Produkte, die zwischen 50° und 70° C zerfloßen. Erst eine Chloroform-Methanol-Fraktion (1:1 v/v) brachte das Genin zutage. Dieses wurde zweimal mit Alkohol umkristallisiert.
Das auf diese Weise gereinigte Genin wurde dann möglichst in ganz wenig Alkohol gelöst, auf 60° C erwärmt und dann nach RUHKOPF und MOHS, 1936, mit soviel Wasser versetzt, daß gerade eben Opaleszens auftrat. Nach 7 Tagen bei + 4° C hatten sich lange, farblose Nadeln und kreisrunde Nadelbüschel gebildet, die bei 235° C unter Zersetzung schmolzen, nachdem ab etwa 205° C die feinen Nadeln in dem LEITZ-Heiztischmikroskop derbere Gestalt annahmen.

Aus Verisdroge wurde auf diese Weise 35 mg und aus Elatiordroge etwa 30 mg Genin gewonnen. Die Mischprobe der

beiden Produkte gab keine Schmelzpunkterniedrigung.

Vergleichswerte aus der Literatur

RUHKOPF und MOHS, 1936. "Elatigenin", Schmp.220° C, über das Diazetat gereinigt, Schmp.241° C.
MARGOT und REICHSTEIN, 1942. "Primulagenin A", sowohl aus Veris- als auch aus Elatiordroge gewonnen, Schmp.248°-250° C nach Reinigung über das Diazetat.

Das selbst gewonnene Genin wurde papier- und dünnschichtchromatographisch untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß es gegenüber dem Glykosid entsprechend seinem weniger polaren Charakter einen höheren Rf-Wert (über 0,9) bei Verwendung des Fließmittel-Gemisches Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2 v/v/v) aufweist (V.1.b. und V.2.b.). Außerdem wurde festgestellt, daß lediglich das Primulagenin, nicht aber die Zucker, mit dem für die Detektion von Chromatogrammen entwickelten Reagenz, das zur Entwicklung des Saponins geeignet war, rot angefärbt werden. Schließlich konnte gezeigt werden, daß mit dem unter VI.1.b. für eine photometrische Messung entwickelten Reagenz das Genin wie in seiner glykosidischen Bindung rot gefärbt wird. Dadurch ist die Gewähr gegeben, daß das Aglykon des Saponins die gewünschte Farbe liefert.

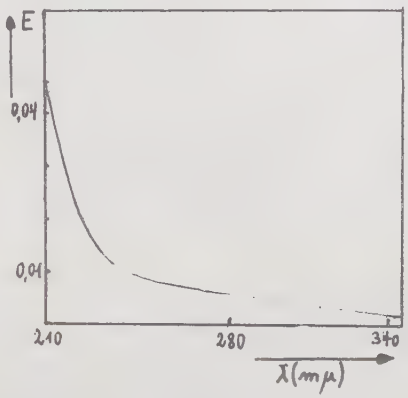
IV. 9. UV - Absorption

Da nach STEINER und HOLTZEM, 1955, zur Kennzeichnung der Triterpene und Triterpensaponine außer den klassischen Konstanten die Absorptionsverhältnisse im Ultraviolett und Infrarot dienen, wurde zunächst natives Verissaponin im UV untersucht. In Übereinstimmung mit den Angaben von FINHOLT, 1955, der für Natriumprimulat im UV kein charakteristisches Absorptionsmaximum gefunden hatte, zeigte auch das neutrale native Verissaponin im Wellenbereich von 210 - 380 mμ bei einer Transmissionsmessung kein Absorptionsmaximum.
Es wurde die Absorption einer 0,009%igen wässrigen Lösung von neutralem nativem Verissaponin im Wellenbereich von

210 - 380 mμ gegen entmineralisiertes Wasser gemessen. Die Zeitspanne zwischen Herstellung und Messung der Lösung betrug etwa 1 1/2 Stunden. Die Lösung wurde im zerstreuten Tageslicht aufbewahrt.

BECKMAN DU-Spektralphotometer

mμ	E (d=1cm)
210	0,046
	0,046
215	0,034
	0,034
220	0,025
	0,025
230	0,014
	0,014
240	0,010
	0,010
260	0,009
	0,008
280	0,006
	0,006
300	0,005
	0,005
320	0,004
	0,004
340	0,002
	0,002
360	0,001
	0,000
380	0,001
	0,001

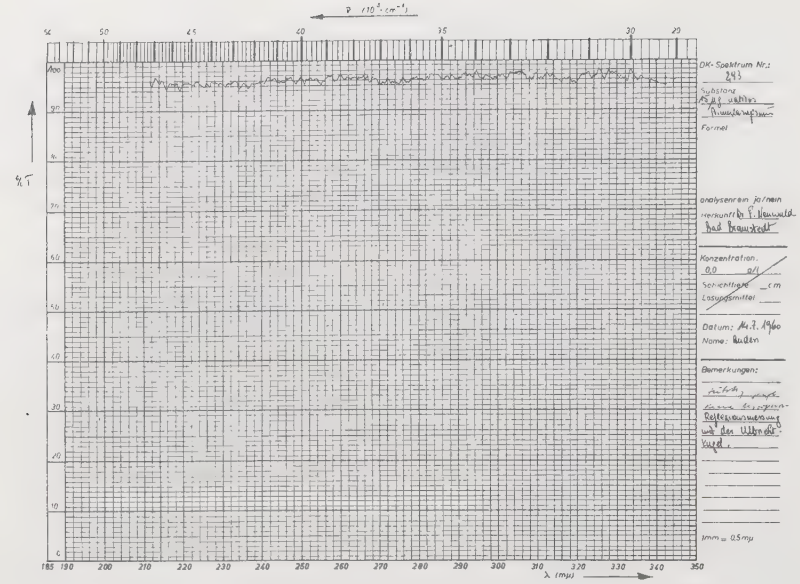


Es wurde kein Absorptionsmaximum festgestellt.

KORTE u. WEITKAMP, 1958, und KORTÜM u. VOGEL, 1959 haben über eine quantitative Auswertung von Papierchromatogrammen durch Reflexionsmessungen bzw. die Aufnahme von Absorptionsspektren papierchromatographisch isolierter Substanzen berichtet.

Außer der UV-Transmissionsmessung wurde ein UV-Absorptionsspektrum der Reflexion von 15 μg neutralem nativem Verissaponin im Wellenbereich von 212 - 342 mμ aufgenommen. Fleckendurchmesser etwa 7mm auf Papier S. & S. 2043a. Die Messung wurde im BECKMAN DK-Gerät mit Ulbricht-Kugel durchgeführt[+].

[+] Herrn Prof.Dr.F.Korte möchte ich an dieser Stelle noch einmal für die Aufnahme des UV-Absorptionsspektrums herzlich danken.



Abbildung

UV-Reflexionsmessung mit Ulbricht-Kugel von 15 µg neutralem nativem Verissaponin

Das Spektrum ist auch als Reinheitsprüfung der selbst isolierten Substanz anzusehen.

IV. 10. Infrarot-Spektren[+)]

Nachdem das Primulasaponin im Ultraviolett keine Absorption gezeigt hatte, wurden zur weiteren Identifizierung von Primulasaponin von verschiedenen Primula-Arten Infrarot-Spektren mit dem registrierenden LEITZ-Infrarot-Spektrographen, Modell II, unter Verwendung eines NaCl-Prismas als Monochromator aufgenommen. Die Substanzen wurden in KBr, 2 - 3 mg Sbst./g KBr, gepreßt. Die Abbildungen 1 - 3 auf der folgenden Seite zeigen die aufgenommenen IR-Spektren.

[+)] Herrn Dr.K.Maennchen, ERNST LEITZ GmbH, Wetzlar, sei für die Aufnahme der IR-Spektren herzlich gedankt.

Infrarot-Spektren

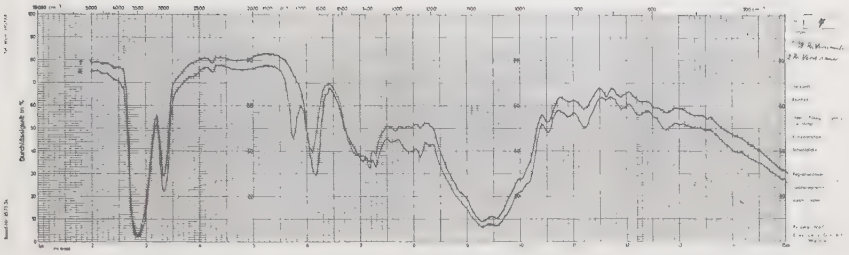


Abbildung 1

1 Neutrales natives Verissaponin
2 Saures Verissaponin

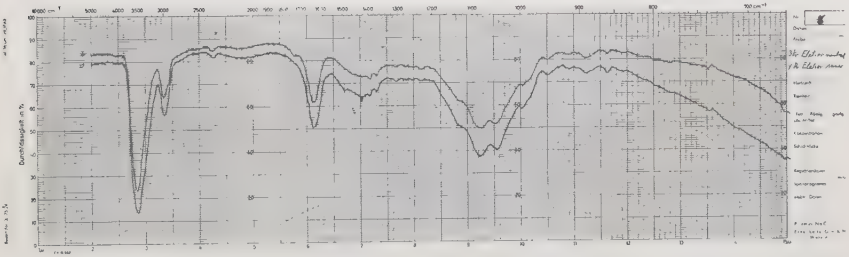


Abbildung 2

1 Saures Elatiorsaponin
2 Neutrales natives Elatiorsaponin

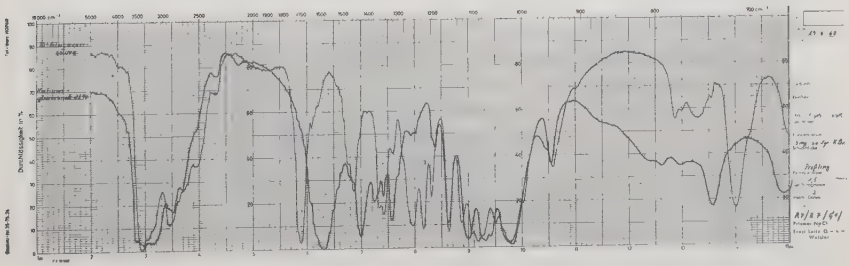


Abbildung 3

1 D-Glukuronsäure
2 Kaliumglukuronat

Die Abbildung 1 zeigt die IR-Spektren von neutralem nativem und saurem Verissaponin. Die beiden Spektren unterscheiden sich lediglich im Bereich der Doppelbindungsvalenzschwingungen durch das Fehlen der Carbonylbande bei 5,75 µ beim neutralen nativen Verissaponin. Bei dem nativen Saponinsalz wird die Carbonylschwingung in den Bereich der C=C-Valenzschwingung (6,15 µ) verschoben, verstärkt diese und wird dadurch maskiert. Die Deutung der Verschiebung der Carbonylschwingung bei Salzbildung wird unterstützt durch die vergleichende Betrachtung dieses Wellenbereiches in den IR-Absorptionsspektren von reiner D-Glukuronsäure (saurer Bestandteil des Primulasaponins) und ihrem Kaliumsalz (Abbildung 3).

Die Abbildung 2 zeigt die IR-Spektren von saurem und neutralem nativem Elatiorsaponin. Ein Vergleich der Elatiorsaponine mit den entsprechenden Verissaponinen zeigt, daß das saure Verissaponin gegenüber dem sauren Elatiorsaponin lediglich eine intensivere Carbonylschwingung bei 5,75 µ aufweist. Die Intensität ist aber in diesem Fall durch die Konzentration bedingt, die etwas verschieden war.

Bei der Betrachtung der IR-Spektren allgemein ist außerdem die verdoppelte CH_3-Deformationsschwingung bei 7,2 und 7,3 µ gleich gut zu erkennen. Die zwischen 9 und 10,5 µ auftretende ausgeprägte Bande rührt von den freien OH-Gruppen der Zucker her und ist für Glykoside typisch. Die starke Valenzschwingung bei 2,85 µ ist ebenfalls den freien Hydroxylgruppen zuzuordnen. Die sich unmittelbar anschließende Valenzschwingung bei 3,3 µ rührt von den CH_3-Gruppen des Saponinmoleküls her.

Als Vergleichsmöglichkeit stand in der Saponin-Literatur nur das Aescin-IR-Spektrum (WINKLER u. PATT, 1960, und NEUWALD u. OVERLACH, 1960) zur Verfügung. Gegenüber dem Aescin-Spektrum fällt auf, daß die Intensitäten der Carbonylschwingung und der C=C-Schwingung im Bereich von 7,3 µ beim Aescin nur einfach ist und daß beim Kalium-Aescinolat die Carbonylschwingung gegenüber der freien

Säure wie beim Primulasaponin verschoben und damit maskiert wird.

Durch die IR-spektrophotometrischen Aufnahmen von Veris- und Elatiorsaponin, in neutraler nativer und in saurer Form, konnte festgestellt werden, daß sowohl das neutrale native Veris- und Elatiorsaponin als auch die entsprechenden "Primulasäure" und "Elatiorsäure" identisch sind.

IV. 11. Hämolytische Wirksamkeit

Entsprechend den unter III.4. genannten Vorschriften wurde die hämolytische Wirksamkeit von reinem Primulasaponin bestimmt, das aus Handelsdroge und selbst geernteten Wurzeln und Rhizomen von Primula veris und P.elatior in neutraler nativer und saurer Form gewonnen wurde. Ferner wurde vergleichsweise das dem neutralen nativen Saponin entsprechende aus saurem Primulasaponin selbst hergestellte Kaliumprimulat in die Untersuchungen mit einbezogen.

Als Bezugssubstanz für die Wirksamkeit des Primulasaponins wurde der Saponin-Standard Ph.Helv.V benutzt.

Zur Tabelle auf der folgenden Seite:

I. Faktor der Prüf- bzw. Standardlösung
II. Nummer der geringsten totalhämolysierenden Konzentration der Prüf- bzw. Standardlösung im Doppelversuch
III. Mittlere Gewichtsmenge Saponin, die 1 ml Erythrozytensuspension eben noch völlig hämolysiert
IV. Volumen Erythrozytensuspension, die durch 1 cg Saponin eben noch völlig hämolysiert wird
V. Hämolytischer Index
VI. Wirksamkeitsfaktor auf Saponin-Standard bezogen

Tabelle

	I	II	III	IV	V	VI
	Faktor cg	Nr. 1/100 ml	µg	ml	H.I.	Faktor
1)Sap.-Standard Ph.Helv.V 1cg=1Ph.-Helv.-E. (Gypsophila-saponin)	1,00	85 85	85	117	25000	1,00
2)Elatiorsaponin neutral nativ	1,05	65 65	68	147	31250	1,26
3)Verissaponin neutral nativ	0,85	80 85	70	143	30600	1,22
4)Saponin aus Handelsdroge B, neutral	1,12	60 60	67	149	31500	1,26
5)Kaliumprimulat aus saurem Verissaponin	0,90	75 75	68	147	31250	1,25
6)Elatiorsaponin sauer	0,95	65 60	59	169	36000	1,44
7)Verissaponin sauer	0,90	70 75	65	153	32750	1,31
8)Saponin aus Handelsdroge B, sauer	0,95	65 65	62	160	34250	1,37
9)Primulasaponin "Beiersdorf" F=240°-245° C Trockn.1/4 Std. 105° C; 3 Stdn. Vakuumexsikkator über Kieselgel	1,00	70 70	70	143	30600	1,22

Da es sich bei den aus verschiedenem Drogenmaterial isolierten neutralen und sauren Saponinen um miteinander identische Substanzen handelt, sind die Differenzen der Substanzproben 2, 3 und 4 sowie 6, 7 und 8 hinsichtlich des hämolytischen Indizes und des aufgeführten Wirksamkeitsfaktors auf den Fehler der Methode zurückzuführen. Der hämolytische Index des neutralen nativen Primulasaponins (Substanzen 2, 3 und 4) als Mittelwert

aller Bestimmungen beträgt etwa 31100. Der hämolytische Index des sauren Primulasaponins (Substanzen 6, 7, 8) als Mittelwert der Bestimmungen beträgt etwa 34350. Das neutrale native Primulasaponin ist demnach um etwa 25 % hämolytisch wirksamer als der Saponin-Standard Ph.Helv.V. Diese Tatsache ist für die Bewertung der hämolytischen Wirksamkeitsbestimmungen von Primuladroge wichtig. Wenn nämlich das Primulasaponin eine vielfach stärkere oder schwächere Wirksamkeit gegenüber dem Saponin-Standard inne gehabt hätte, so hätte sich das ungleiche Konzentrationsverhältnis in den Verdünnungsreihen ungünstig auf die Ergebnisse der sehr konzentrationsempfindlichen Hämolysebestimmung auswirken können.

Unter Berücksichtigung des methodisch bedingten Fehlers von ± 10 % (FUCHS und KOCH, 1950) liegt der Wirksamkeitsunterschied (+ 12%) bei gleichen Einwaagen zwischen neutralem nativem und saurem Elatiorsaponin an der Fehlergrenze der Methode. Berücksichtigt man jedoch das geringere Molekulargewicht des sauren Saponins, so liegt die Differenz der hämolytischen Indizes innerhalb der Fehlerbreite. Das gleiche Bild ergibt sich, wenn die Fehlergrenze der Hämolysebestimmung nach RUNGE, 1952, in einer Richtung mit + 20 % angenommen wird. Wie die Werte der Tabelle auf der vorherigen Seite für die Verissaponine zeigen, liegt hier der gleichgerichtete Wirkungsunterschied (etwa 7 %) auch innerhalb der Fehlergrenze.
Ferner zeigt ein Vergleich der Werte 2 und 5 der Tabelle auf der vorherigen Seite, daß das aus saurem Verissaponin gewonnene Salz die gleiche hämolytische Wirksamkeit wie das neutrale native Elatiorsaponin hat.

Berechnung des relativen Saponingehalts der Primuladroge.

Der relative Saponingehalt der Droge wurde aus dem Verhältnis der hämolytischen Wirksamkeit der Droge (siehe III.4.) und der daraus isolierten Saponine auf neutrales natives Primulasaponin (mittlerer Wirksamkeitsfaktor 1,25)

berechnet.

Handelsdroge B. Die hämolytische Wirksamkeit von 1,00 g Droge entsprach 0,133 g Saponin-Standard Ph.Helv.V.

Gehalt: 10,6 %

Primula veris. Die hämolytische Wirksamkeit von 1,00 g Droge entsprach 0,118 g Saponin-Standard Ph.Helv.V.

Gehalt: 9,5 %

Primula elatior. Die hämolytische Wirksamkeit von 1,00 g Droge entsprach 0,152 g Saponin-Standard Ph.Helv.V.

Gehalt: 12,1 %

Den Ergebnissen der Berechnung des relativen Saponingehalts der Primuladroge muß eine Fehlerbreite von ± 20 % eingeräumt werden.

IV. 12. Besprechung der Ergebnisse

Das Primulasaponin wurde bisher als ein saures Saponin ("Primulasäure" und "Elatiorsäure") betrachtet. Dabei gelangten die verschiedenen Autoren zu mitunter sehr unterschiedlichen Beurteilungen hinsichtlich der Löslichkeit, des Aussehens und der hämolytischen Wirksamkeit des Saponins. Es konnte in den vorhergehenden Abschnitten dieser Arbeit gezeigt werden, daß das Primulasaponin in der Droge außer in Form der freien Säure auch als neutrales kaliumhaltiges Salz vorliegt und daß es in dieser Form,auch aber als aus "Primulasäure" gewonnenes Salz, gegenüber dem sauren Saponin wesentlich stabiler ist. Dabei mag erwähnt werden, daß das in der Süßholzwurzel vorkommende Glycyrrhizin ebenfalls ein Salz darstellt, nämlich das Ca-K-Salz der Glycyrrhizinsäure.
Das aus dem sauren Verissaponin gewonnene Kaliumprimulat hat die gleiche hämolytische Wirksamkeit wie das neutrale native Primulasaponin. Im Bereich der Fehlerbreite des

Hämolyseverfahrens ist das salzartig gebundene Primulasaponin hämolytisch ebenso wirksam wie das daraus zu gewinnende saure Saponin. Die Diskrepanz zwischen den Schmelzpunkten von neutralem nativem Primulasaponin und Kaliumprimulat konnte nicht erklärt werden. Als Bezugsgröße für die quantitative Analyse wurde das neutrale native Saponin ausgewählt, da es stabiler ist und die Eigenschaften einer Standardsubstanz besitzt.

Das Mengenverhältnis des in der getrockneten Wurzel vorhandenen neutralen und sauren Saponins scheint bei Veris- und Elatiordroge verschieden zu sein. In der Handelsdroge B (Mischung von Elatior- und Verisdroge) wurde vorwiegend das saure Saponin gefunden.

Spezielle Untersuchungen

V. Chromatographische Untersuchungen des Primulasaponins, Primulagenins, der Primuladroge und Primulazubereitungen

V. 1. a. Papierchromatographie

Die Auszüge von Frischpflanzen und Droge von Primula-Arten wurden bisher auf chromatographischem Wege in qualitativer und quantitativer Hinsicht wenig untersucht. SCHINDLER, 1955, beschreibt ein Papierchromatogramm von einer Urtinktur aus Primula veris im UV-Licht. Das Saponin wurde dabei aber nicht angesprochen. FINHOLT, 1957, untersuchte das Natriumsalz der Primulasäure, wie KRANEN-FIEDLER, 1956, das Aescin, und besprühte das Papierchromatogramm nach der Entwicklung mit Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5 v/v/v) mit einer 3%igen Blutsuspension (siehe V.1.d.).

Für Vorversuche stand ein von der Fa. Beiersdorf & Co., Hamburg, freundlicherweise zur Verfügung gestelltes Primula-Rohsaponin zur Verfügung.
Hauptsächlich sollte danach versucht werden, das nach dem Verfahren der vorliegenden Arbeit isolierte neutrale native Primulasaponin chromatographisch auf seine Reinheit zu prüfen. Daneben sollte versucht werden, für das Primulasaponin mit der Chromatographie einen spezifischen Nachweis für die Untersuchung galenischer Primulazubereitungen auszuarbeiten.

V. 1. b. Detektion des Primulasaponins und Primulagenins mit einem Farbreagenz

Das für die Identifizierung von Triterpenen gut geeignete

AntimonIIIchlorid ruft bei Anwesenheit von Primulasaponin einen unspezifischen grauen Fleck hervor. Es zeigte sich aber, daß eine Mischung eines Aldehyds vom Typ des Vanillins (z.B. neben Vanillin auch Piperonal) mit AntimonIIIchlorid bei Anwesenheit von Primulasaponin eine intensive Rot-Violett-Färbung ergibt. Am besten eignet sich für die Detektion eine Lösung von 1 Teil Vanillin und 2 Teilen AntimonIIIchlorid in 47 Teilen Chloroform. Es wurden 4%ige Vanillin- und 8%ige AntimonIIIchlorid-Lösungen für eine Woche vorrätig gehalten, die vor der Verwendung zu gleichen Teilen gemischt wurden. Das Anfärben kann durch Besprühen mit einem Zerstäuber vorgenommen werden. Einen besonderen Vorteil der gleichmäßigeren Anfärbung bietet jedoch folgende schnelle Methode: Das Papier wird auf einer Glasplatte schräg über einen Ablauf gehalten und mit dem Reagenz begossen. Nach dem Abtropfen wird, wie bei der sog. Tauchmethode, das Papier in den Trockenschrank gehängt, der vorher auf eine Temperatur von 95° - 100° C eingestellt worden ist. Der Saponinfleck läuft nicht aus, da das Saponin in Chloroform so gut wie unlöslich ist. Nach 1 - 2 Minuten entwickeln sich die für Primulasaponin typischen rot-violetten Flecke. Eine etwaige Gelbfärbung des Papiers verschwindet nach 1/2 Stunde. Die auf diese Weise angefärbten Papierchromatogramme zeigten eine über 1 Jahr lang gleichbleibende Qualität der Farbflecke.

Die gleiche Färbung wird auf dem Papierchromatogramm auch bei Anwesenheit des Primulagenins erhalten. Die bei der Hydrolyse abgespaltenen Zucker geben mit dem oben erwähnten Reagenz lediglich grau-schwarze Flecke. Das Reagenz spricht somit auf den Triterpenkörper des Primulasaponins an.

Anschließend wurde versucht, in einer vergleichenden Testreihe von triterpenhaltigen Auszügen festzustellen, in wieweit das Reagenz für das Primulagenin spezifisch ist. Es wurden Auszüge von Cortex Quillajae Saponariae (Quillajasäure), Radix Polygalae Senegae (Senegin), Semen Aesculi Hippocastani (Aescin), Radix Glycyrrhizae glabrae

(Glycyrrhizin) und Folia Arctostaphyli uvae ursi (Ursolsäure, Uvaol) untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß allein ein Auszug von Bärentraubenblättern neben anderen Farbflecken nach dem im nächsten Abschnitt beschriebenen Entwicklungsverfahren einen wie Primulasaponin gefärbten Fleck (Uvaol?) zeigte, der allerdings einen wesentlich geringeren Rf-Wert aufwies.
Bei diesen vergleichenden Untersuchungen, z.B. mit einem methanolischen Bärentraubenblätter-Auszug, zeigte sich nach Entwicklung und Detektion ein derart prächtiges Bild von verschieden gefärbten Zonen auf dem Papier, daß das Reagenz sicherlich in Zukunft neben den Untersuchungen von Primulasaponin noch weitere Verwendung finden kann.

V. 1. c. Entwicklung

Als Entwicklungsgefäß diente ein Standgefäß aus 5 mm dickem Glas (äußere Vermessung 21:8, 5:33 cm), das mit einem plangeschliffenen Deckel abzudecken war. Das Papier wurde an einem Glasrechen aufgehängt, der durch den Deckel geführt wurde.
Nach eingehenden Vorversuchen ergab sich, daß das Primulasaponin am besten mit einem Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (4:1:2 v/v/v) als Fließmittel nach der aufsteigenden Methode entwickelt wird. Es bildeten sich bei einer eindimensionalen Laufstrecke von 15 cm (Papier: S.&S. 2043bMgl, Zeit: 5 Stunden, 20° C), bei einer Belastung mit etwa 50 µg Saponin 2 - 3 cm lang gestreckte Flecke mit einem Rf-Wert von 0,56 - 0,57. Der Faktor änderte sich nicht, wenn die Fließmittelfront nach verschiedenen Zeitabläufen zwischen 13 und 20 cm vom Startpunkt entfernt lag. Die Papierstreifen wurden für die adsorptive Bindung des Wassers an die Baumwollcellulose (sog.Gelatbildung) vor der Entwicklung 1/2 Stunde in dem Chromatographiergefäß äquilibriert. Eine Verlängerung der Vorhängezeit rief keine Veränderung der Saponinflecke hervor.
Bei der Verwendung des schwereren Papiers 2045bM (S.&S.) traten nach einer Laufzeit von 6 Stunden und einer

Fließstrecke von 13 cm gleiche Rf-Werte von 0,5 auf. Dieses Papier hat zwar den Vorteil, daß die Farbflecke in der Breite nicht auseinanderlaufen, der Nachteil liegt aber darin, daß längere Laufzeiten benötigt werden, während keine bessere Trennschärfe der Zonen erzielt wird.

Entwicklung von neutralem nativem und saurem Primulasaponin nebeneinander.

Es wurde je 500 µg Primulasaponin aufgetragen und mit dem Fließmittelgemisch Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2 v/v/v) entwickelt. Dabei zeigte sich die Einheitlichkeit des sauren und des neutralen nativen Primulasaponins durch die jeweilige Ausbildung eines einzigen Flecks. Anschließend wurden nebeneinander je 20 µg neutrales natives und saures Verissaponin aufgetragen. Dabei traten vier Saponinflecke nach der Entwicklung mit den gleichen Rf-Werten von 0,56 - 0,57 auf (Papier: S.&S. 2043bMgl, Zeit: 5 Stunden, 20° C, Laufstrecke 15 cm). Die jeweiligen Saponinflecke wurden aus dem Papierchromatogramm ausgeschnitten und das Saponin mit Methanol vom Papier eluiert. Die Schmelzpunkte deckten sich bei allen Proben mit denen des sauren Saponins. Es wird also das neutrale native Saponin durch den Verteilungsgang, bei dem Essigsäure anwesend ist, in das saure Saponin abgewandelt. Neutrales natives und saures Primulasaponin wird dabei in den Zustand gleicher Polarität versetzt.

Ein durch hydrolytische Spaltung des Primulasaponins gewonnenes Primulagenin (IV.8.) besaß einen Rf-Wert von über 0,9.

Vergleichsweise wurde saures und neutrales natives Verissaponin nebeneinander mit dem neutralen Fließmittelgemisch Butanol-Alkohol-Wasser (10:1:4 v/v/v), mit dem WINKLER und PATT, 1960, Aescin entwickelt haben, chromatographiert. Beide Saponinflecke waren 2 cm lang gestreckt und besaßen den gleichen Rf-Wert von 0,29 (Laufzeit 4 1/2 Stunden, Strecke Start-Fließmittelfront 12 cm, Papier S.&S. 2043-bMgl, 20° C, aufsteigend). Dieses Fließmittelgemisch zeigte somit gegenüber dem vorher beschriebenen, essig-

säurehaltigen Fließmittel keinen Vorteil, sondern nur den Nachteil eines wesentlich geringeren Trenneffektes. Außerdem konnte auch durch mehrfaches Verändern der Konzentration der Fließmittelkomponenten die Rf-Werte der Saponinflecke wohl verändert, ihre starke Schwanzbildung aber nicht verhindert werden.

Abbildung. Papierchromatogramm von neutralem nativem Primulasaponin und galenischen Zubereitungen aus Droge und Frischpflanze

Abbildung auf der vorigen Seite. Papierchromatogramm.

1.) Urtinktur Primula obconica SCHWABE 10 µl
2.) Urtinktur Primula veris SCHWABE 10 µl
3.) Tinctura Primulae A (VI.4.) 5 µl
4.) Stadatrat Primulae comp. B (VI.4.) 5 µl
5.) Tussipect Hustentropfen(R) 10 µl
6.) Neutrales natives Verissaponin 60 µg

Die Abbildung (Originalgröße) wurde mit Contaflex, Tessar 1:2,8 mit Vorsatzlinsen Proxar f=1m und f=0,5m, aufgenommen.

Das Saponin der Urtinktur unter Nr. 2 ist anscheinend während der Lagerung bei einem pH-Wert von unter 6 hydrolytisch gespalten worden, da nur das Primulagenin und Zucker im Chromatogramm in Erscheinung traten.

Wie das Papierchromatogramm zeigt, ließ sich das Primulasaponin in den galenischen Präparaten einwandfrei nachweisen, sofern es nicht in diesen während der Lagerung hydrolytisch gespalten worden war.

V. 1. d. Detektion des Primulasaponins mit Hämolyse

Außer der Detektion mit einem Farbreagenz wurde auch die Hämolyse zum Nachweis von Primulasaponin auf dem Papierchromatogramm nach einem von KRANEN-FIEDLER, 1956, für Aescin beschriebenen Verfahren herangezogen. Als Fließmittel für das Primulasaponin diente das bewährte Gemisch von Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2 v/v/v). (Papier S. & S. 2043bMgl; Fließzeit 5 1/2 Stunden). Nach dem Trocknen wurde das Papier nach KRANEN-FIEDLER mit einer Blutsuspension besprüht. Besser bewährte sich in dieser Arbeit das Baden des Papierbogens in der Blutaufschwemmung auf einer Glasplatte. Das Zitratblut und die Pufferlösung (siehe III.4.) wurden im Verhältnis 1 : 8 gemischt. Mit dieser Mischung wurde die Glasplatte benetzt, das Papier aufgelegt und nach einer Minute wieder

abgenommen. Danach wurde es in feuchtem Zustand an einem dunklen Ort aufgehängt. Nach ein paar Minuten zeigte sich infolge Hämolyse an den Stellen, wo Saponin vorhanden war, eine Verfärbung. Noch 10 µg Primulasaponin bildete einen deutlichen hämolytischen Hof aus, so daß dieses Verfahren als außerordentlich empfindlich bezeichnet werden kann.

Abbildung. Ein mit Zitratblut detektiertes Papierchromatogramm zum Nachweis von Primulasaponin

1.)	Primula obconica Urtinktur SCHWABE	10 µl
2.)	Primula veris Urtinktur SCHWABE	10 µl
3.)	Stadatrat Primulae comp. (VI.4.)	10 µl
4.)	Tussipect Hustentropfen(R)	10 µl
5.)	Neutrales natives Verissaponin	50 µg

Die Abbildung zeigt, daß in der Urtinktur von Primula veris, die sofort nach Bezug aus dem Auslieferungslager der Herstellerin untersucht wurde, kein Saponin nachgewiesen werden konnte. Unter V.1.c. wurde gezeigt, daß das Saponin in der untersuchten Tinktur anscheinend durch

hydrolytische Spaltung zersetzt war. Die Spaltung des Glykosids kann durch die Feststellung des sauren Charakters der Tinktur (pH unter 6) erklärt werden.
Der Fleck "b" bei 4 (Tussipect Hustentropfen(R)), der sich wesentlich langsamer als der Primulasaponinfleck entwickelte, rührt anscheinend von einer anderen hämolytisch wirksamen Substanz(Glycyrrhetinsäure ?) her.

V. 2. a. Dünnschichtchromatographie des Primulasaponins und des Primulagenins

Da auf dem Papierchromatogramm wegen der länglichen Form der Saponinflecke nicht einwandfrei geklärt werden konnte, ob das saure Saponin gegenüber dem neutralen nativen einen anderen Rf-Wert aufweist, wurde die große Trennschärfe der Dünnschichtchromatographie zur Untersuchung dieser Frage herangezogen.

V. 2. b. Entwicklung

Bei der Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme wurde nach der von STAHL, 1959, angegebenen Arbeitsvorschrift verfahren. 200x200 mm große und 4 mm starke Trägerplatten aus Glas wurden mit einer gleichmäßig verrührten Masse aus dem Adsorbens Kieselgel G MERCK und Wasser mit Hilfe des Dünnschicht-Streichgerätes auf der vorgeschriebenen Arbeitsschablone überzogen. Die Platten wurden nach dem Abbinden der Trennschichten und anschließendem 1/2stündigem Trocknen bei 105° C in einem mit Blaugel gefüllten Exsikkator aufbewahrt. Die aufgetragene Adsorptionsschicht ist nach Angabe des Herstellers des Streichgerätes 275 µ dick.
Als Fließmittel wurde die bereits bei der Papierchromatographie verwendete Mischung von Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2 v/v/v) herangezogen. Die gläserne Trennkammer (10x22x23 cm) wurde jeweils so weit mit Fließmittel gefüllt, daß die Adsorptionsschicht auf der Platte 2 - 3 mm

hineinragte, und die Startlinie sich etwa 1 cm über dem Flüssigkeitsspiegel befand. Das Dünnschichtchromatogramm Nr. 2 (Abbildung) wurde abweichend bei "Kammerübersättigung" entwickelt. Hierzu wurde auf beiden Seiten der Trennkammer je ein mit dem Fließmittel getränkter, 20 cm langer Papierstreifen (S. & S. 2043a) fixiert, der mit dem Fließmittel weiter in Berührung blieb.

V. 2. c. Detektion des Saponins und Genins mit einem Farbreagenz

Das Sichtbarmachen der Flecke wurde durch Besprühen mit einer Lösung von 1 Teil Vanillin, 2 Teilen AntimonIII-chlorid in 47 Teilen Chloroform (siehe V.1.b.) und anschließendes 2 - 3minutiges Erwärmen im Trockenschrank bei 100° C erreicht. Hiernach leuchteten die Saponin- und Geninflecke rot-violett auf. Die durch Hydrolyse von Saponin abgespaltenen Zucker wurden bei der gleichen Behandlung dunkelgrau-braun gefärbt. Die Farbflecke des sauren und des neutralen nativen Primulasaponins zeigten die gleichen Rf-Werte. Sauer reagierende Frischpflanzenauszüge von Primula veris, die mehr oder weniger lang gelagert waren, zeigten teilweise hydrolysiertes Saponin. Das Primulagenin wies stets einen Rf-Wert von über 0,9 auf.

Die Saponinflecke hatten nach einer Aufbewahrungszeit der Chromatogramme von 1 Monat bei 18° C nichts von ihrer ursprünglichen Farbintensität eingebüßt. Sie konnten noch nach 6 Monaten einwandfrei ausgewertet werden.

Die Dokumentation erfolgte durch Schwarz-Weiß-Aufnahmen mit Contaflex, Tessar 1:2,8 mit Vorsatzlinsen Proxar f = 1 m und f = 0,5 m.

Dünnschichtchromatogramme von Primulasaponin, Primulagenin und galenischen Zubereitungen

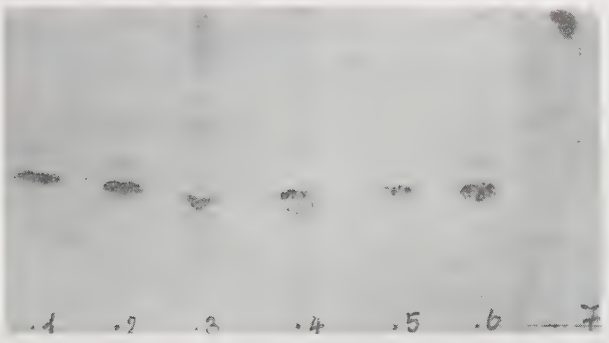


Abbildung 1

1.)	Neutrales natives Verissaponin		50 µg
2.)	Neutrales natives Elatiorsaponin		50 µg
3.)	Tussipect Hustentropfen(R)		10 µl
4.)	Stadatrat Primulae comp.(VI.4.)		10 µl
5.)	Saures Verissaponin		50 µg
6.)	Saures Elatiorsaponin		50 µg
7.)	Primulagenin	etwa	20 µg

Laufzeit: 3 Stunden. Ohne Kammerübersättigung.
Strecke Start-Fließmittelfront 10 cm.
Rf-Werte für Primulasaponin 0,42 - 0,44.

Abbildung 2

Abbildung 2

1.)	Primula veris Urtinktur MADAUS pH 5,90	20 µl
2.)	Primula veris Urtinktur MADAUS pH 5,90	10 µl
3.)	Primula obconica Urtinktur SCHWABE pH 5,95	20 µl
4.)	Primula obconica Urtinktur SCHWABE pH 5,95	10 µl
5.)	Neutrales natives Verissaponin Rf-Wert 0,45	15 µg
6.)	Tussipect Hustentropfen(R)	5 µl

Laufzeit: 3 1/2 Stunden. Mit Kammerübersättigung. Strecke Start-Fließmittelfront 11 cm.

Das Saponin in der untersuchten Primula veris Urtinktur ist dem unter V.1.c. und V.1.d. schon erwähnten hydrolytischen Einfluß teilweise zum Opfer gefallen.

Alle Dünnschichtchromatogramme wurden bei einer Temperatur von 18° - 20° C entwickelt.

V. 3. Diskussion über die Papier- und Dünnschichtchromatographie zur Trennung und Identifizierung von Primulasaponin

Das Primulasaponin läßt sich sowohl papier- als auch dünnschichtchromatographisch aus jeder primulahaltigen galenischen Zubereitung und Drogenmischung durch einen Vergleich der Größe und der Farbintensität der Saponinflecke gegenüber bestimmten Mengen Reinsubstanz, die man vergleichsweise auf demselben Chromatogramm mitlaufen läßt, nachweisen. Das Saponin wird dabei in der sauren Form analysenrein von den Begleitstoffen getrennt, eine halbquantitative Bestimmung ist deshalb leicht durchzuführen. Es konnte nachgewiesen werden, daß in den Wurzeln derselbst geernteten, blühenden Pflanze von Primula veris und P.elatior kein freies Primulagenin anwesend ist. Das Vorkommen von Nebensaponinen (MARGOT und REICHSTEIN, 1942) wird nach den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen angezweifelt.

Die Dünnschichtchromatographie hat gegenüber der Papierchromatographie einen besseren Trenneffekt. Das Dünnschichtverfahren ermöglicht die Identifizierung und den einwandfreien Nachweis des Primulasaponins neben seinen Spaltprodukten und erweist sich somit zur Beurteilung von Droge und Drogenauszügen unbekannten Alters als wertvoll.

Es gelang so auch einwandfrei festzustellen, daß ein Handelspräparat eines wasserlöslichen Bronchial-Tee-Extraktes, der mit einem Gehalt von 10 % Primula deklariert war, keine nachweisbare Menge Primulasaponin enthielt. Anscheinend war das Saponin bei der Herstellung des Trockenextraktes zerstört oder durch das Darstellungsverfahren des bei der Trockenextraktbereitung verwendeten Pflanzenauszuges nicht oder nur in einem minimalem Maße erfaßt worden.

VI. Ein Farbtest zum qualitativen und quantitativen Nachweis des Primulasaponins

VI. 1. a. Reaktion mit Triterpenreagenzien

Nach STEINER und HOLTZEM, 1955, gibt es noch keine quantitative chemische Methode zur Saponinbestimmung. Neuerdings haben NEUWALD und OVERLACH, 1960, eine solche Methode für analysenreines Aescin beschrieben. Diese Methode eignet sich allerdings nicht für eine qualitative und quantitative Aescin-Bestimmung aus Droge oder galenischen Zubereitungen, weil das Reagenz wegen der hohen Schwefelsäurekonzentration und der dadurch bedingten unspezifischen Eigenschaft nur aus analysenreinem Aescin eine photometrisch meßbare Farblösung entstehen läßt.
Nach eigenen Versuchen mit Primulasaponin und dem Aescin-Reagenz (p-Dimethylaminobenzaldehyd gelöst in Essigsäure

und Schwefelsäure) wurde nur eine unbeständige rot-violette Färbung erhalten.
In dieser Arbeit sollte unter Vermeidung einer zu hohen Säurekonzentration der Farblösung ein für Primulasaponin spezifischer Farbtest gefunden werden, der für die quantitative Bestimmung des Primulasaponins in der Droge und ihren galenischen Zubereitungen geeignet ist.

Bei den folgenden Farbtesten wurden nebeneinander untersucht:

das neutrale native Saponin von Primula veris und P.elatior,

das saure Saponin von den gleichen Primula-Arten und

das saure Saponin aus Handelsdroge B, die aus Wurzeln beider Primula-Arten bestand.

Erwartungsgemäß zeigten die verschiedenen Herkünfte des Primulasaponins kein unterschiedliches Verhalten gegenüber den Farbreagenzien.

Reaktion nach SALKOWSKI, 1908.
Etwa 5 mg Saponin wurde mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Es entstand sofort eine tiefrote Farbe, die nach 1 Minute in Violett übergegangen war. Für die Aufstellung einer Farbkurve für eine photometrische Saponin-Bestimmung war die Farbe nicht geeignet, weil sie nicht beständig genug war und Spuren einer Verunreinigung der Substanz oder auch z.B. eine Faser vom Filtrierpapier starke Farbabweichungen hervorriefen. GERLACH, 1958, empfiehlt die Verwendung von Phosphorsäure anstelle von Schwefelsäure. Mit o-Phosphorsäure (1,7) zeigte Primulasaponin bei 20°C keine Färbung. Durch Erwärmen wurde erst eine gelb, dann eine braune Färbung erhalten. Auffällig war dabei lediglich eine starke Fluoreszens, die bei Anwesenheit von Primulasaponin am besten auf einem mit Phosphorsäure bestrichenen Papierchromatogramm im UV-Licht zu sehen ist.

Reaktion nach LIEBERMANN-BURCHARD, 1885.
Etwa 5 mg Saponin wurde in Essigsäureanhydrid unter Erwärmen gelöst. Danach wurde 1 Tropfen konz. Schwefelsäure

hinzugegeben. Es entstand eine grüne Farbe. Weitere Tropfen Schwefelsäure riefen erst eine rote, dann eine tiefviolette Färbung hervor. Durch Zusatz von Wasser entstand wieder die Grünfärbung. BRIESKORN und CAPUANO, 1953, und BRIESKORN und HERRIG, 1959, die sich am Beispiel der Ursolsäure eingehend mit dem schwierigen Problem der chemischen Vorgänge dieser Reaktion befaßten, stellten eine Anlagerung von Schwefelsäure an den Triterpenkörper fest. Leider traten für eine quantitative Auswertung der Färbungen mit Primulasaponin die gleichen Schwierigkeiten wie bei der SALKOWSKI-Reaktion auf.

Reaktion nach TSCHUGAJEW, 1900.
Etwa 5 mg Saponin wurde mit Zinkchlorid und Acetylchlorid versetzt. Es trat eine rosa Farbe auf, die beim Erwärmen braun wurde.

Reaktion nach RUZICKA, 1929.
Etwa 5 mg getrocknete und anschließend mit Chloroform angeschlämmte Substanz zeigte nach Zusatz von Tetranitromethan keine Gelbfärbung; diese trat erst nach Hinzufügen von 1 Tropfen Wasser auf. Die Reaktion war (nach MARGOT und REICHSTEIN, 1942) lediglich für den Nachweis der Doppelbindung im Triterpenskelett des Primulasaponins von Interesse.

Reaktion nach HIRSCHSOHN.
Etwa 5 mg Saponin wurde mit kristalliner Trichloressigsäure erhitzt. Dabei bildete sich eine tiefrote Farbe, die sich über Violett nach Grün-Braun veränderte, wobei alle Farbtönungen ohne Veränderung in Methanol löslich waren.

Reaktion nach BRIESKORN und BRINER, 1953.
BRIESKORN und BRINER entwickelten mit Hilfe der Chlorsul-

fonsäure-Reaktion ein kolorimetrisches Bestimmungsverfahren für Ursol- und Oleanolsäure. Aus diesem Grund wurde etwa 5 mg Primulasaponin mit einigen Tropfen Chlorsulfonsäure in Sesolvan(R) (7 + 3) versetzt. Es trat die für Triterpenkörper spezifische Rotfärbung auf. Dieses Verfahren wurde bei der histochemischen Untersuchung des Rhizoms und der Wurzeln von Primula veris und P.elatior mit Erfolg angewendet(III.2.). Die triterpenhaltigen Zellen färbten sich zunächst orange, dann rot und rotviolett. Die Färbung ließ sich durch Erwärmen beschleunigen. Für eine quantitative Bestimmung mit einer Eichkurve ließ sich diese Reaktion nicht auswerten, weil durch sie keine einheitliche Farbe zu erhalten war.

Reaktion nach ROSENTHALER, 1902.

Etwa 5 mg Saponin wurde mit 1%iger Vanillin-Salzsäure erhitzt. Es bildete sich eine trübe rosafarbene Mischung, die langsam einen grün-bräunlichen Farbton annahm. Trotz dieses zunächst nicht ermutigenden Ergebnisses wurde diese Reaktion der Ausgangspunkt für einen Primula-Farbtest. Es stellte sich nämlich heraus, daß die Farbe der Mischung wesentlich verstärkt wurde, wenn an Stelle der Salzsäure DAB 6 rauchende Salzsäure angewendet wurde. Wenn z.B. auf 5 mg Saponin 2 ml 1%ige Vanillin-Salzsäure (1,19) und als Lösungsmittel 10 ml Eisessig gegeben wurde, bildete sich eine gut meßbare rote Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 500 mμ. Von der Auswertung dieser Reaktion wurde jedoch wegen der Säurekonzentration der Farblösung Abstand genommen.

VI. 1. b. Neues Farbreagenz

Etwa 5 mg Primulasaponin wurde in etwa 1%iger Vanillinrauchender Salzsäure vorsichtig erhitzt. Es trat eine tiefgrüne Färbung auf. Die trübe Mischung wurde mit Isopropanol überschichtet, das 1 Tropfen Vanadin-Schwefelsäure-Reagenz DAB 6 (nach HAGER, 1949, Reagenz nach JORISSEN) enthielt. Es bildete sich an der Berührungszone

ein roter Ring. Beim Umschütteln der Mischung entstand unter gleichzeitiger Klärung des Reagenzgemisches eine kirschrote Farbe.
Diese Farbreaktion wurde nun weiteruntersucht. Dabei stellte sich heraus, daß etwa 5 mg Primulasaponin mit 1%iger Vanillin- (oder Piperonal-)rauchender Salzsäure nach 10 Minuten auch bei Zimmertemperatur eine Grünfärbung und durch Zusatz von einer Mischung Isopropanol (oder Methanol) und Vanadin-Schwefelsäure-Reagenz eine klare Rotfärbung ergeben.

Weitere Versuche zeigten, wie abhängig diese Farbreaktion u.a. von der Reihenfolge des Zusatzes der Reagenzien ist:

1.) Vanillin-rauchende Salzsäure erhitzt, Zusatz von Isopropanol, weiterer Zusatz von Vanadin-Schwefelsäure-Reagenz (im folgenden kurz VSR genannt). Farbe: hellgelb-grün.
2.) Vanillin-rauchende Salzsäure + VSR. Farbe: gelblich, abnehmend. Nach Erhitzen, Farbe: grün-gelb. Nach Zusatz von Isopropanol: völlig farblos werdend. Nach Zusatz von Saponin, das sich durch Erwärmen auflöste, farblos bleibend.
3.) Saponin in Isopropanol gelöst, Zusatz von VSR, Farbe: gelb-grün. Auf Zusatz von Vanillin-rauchender Salzsäure, gelb-grün.
4.) Saponin mit rauchender Salzsäure erhitzt, Zusatz von Isopropanol und schließlich VSR. Farbe: gelb-grün.
5.)Saponin mit VSR erhitzt: keine Färbung. Langsamer Zusatz von Vanillin-rauchender Salzsäure und nach dem Erkalten Zusatz von Isopropanol: leicht rötliche Farbe, aber trotz Anderung der Mengenverhältnisse keine Farbintensität erreichbar.
6.) wie bei 5.), aber statt Vanillin-rauchender Salzsäure einfache rauchende Salzsäure: keine Rotfärbung.
7.) wie 1.) - 6.), aber statt VSR etwa 4vol%ige Schwefelsäure: keine Rotfärbung.

Die Verwendung von Piperonal an Stelle von Vanillin hatte keinen Vorteil. Aus der Reihe der Substanzen, die ebenfalls, aber erfolglos, gegen Vanillin ausgetauscht wurden seien Furfurol, Guajacol, Xanthydrol und Dihydroxynaphthalin erwähnt.
D(+)Glukuronsäure, Galaktose, D-Glukose und L(+)Rhamnose an Stelle des Primulasaponins zeigten mit dem oben erwähnten Reagenz keine Rotfärbung.

Aus diesen Versuchen war zu ersehen, daß folgender Weg zu einer meßbaren roten Farbe des Primulasaponins eingeschlagen werden mußte:
Auf das Saponin wird zunächst Vanillin-rauchende Salzsäure gegeben. Nach 10 Minuten wird dieses Reaktionsgemisch mit Isopropanol, dem vorher etwas Vanadin-Schwefelsäure-Reagenz hinzugesetzt wurde, aufgenommen.

VI. 2. a. Photometrische Bestimmung

Die nach der beschriebenen Reaktion von Primulasaponin rot gefärbten Lösungen wurden mit dem LEITZ-Zweistrahl-Kompensationsphotometer für Transmissionsmessungen mit visueller Ablesung für Farb- und Eichkurven ausgewertet. Dabei zeigte sich, daß die Farbe bei 20° C und zerstreutem Tageslicht überraschend stabil ist, wenn die Reaktionspartner nach folgender Vorschrift zusammentreffen:

2 - 15 mg Primulasaponin (Veris- oder Elatiorsaponin) wird in einem 50ml-Erlenmeyerkolben mit Schliff mit 5 ml (Vollpipette) einer Lösung I versetzt. Nach 10 Minuten wird dieser Mischung 10 ml (Vollpipette) Lösung II hinzugefügt. Die Ablesung erfolgt gegen eine aus 5 ml Lösung I und 10 ml Lösung II bestehende Blindlösung nach 3 Stunden. Das Reaktionsgemisch wird bis zur Messung im Dunkeln bei 20° C (Zimmertemperatur) aufbewahrt.

Bei der Einwaage des Saponins wird ein genau gemessenes Volumen einer methanolischen Stammlösung einpipettiert, das Methanol vor der Bestimmung des Saponins entfernt und der Rückstand bei 105° C 10 Minuten im Trockenschrank getrocknet.

Reagenz.

Lösung I : 1,20 g Vanillin (nach 4 Stdn. Trocknung im Vakuumexsikkator über Kieselgel (Blaugel) wird in rauchender Salzsäure (1,19) zu 50 ml gelöst.

Lösung II: 5,0 g Vanadin-Schwefelsäure-Reagenz DAB 6 wird zu 100 ml mit Isopropanol verdünnt.

10 ml Lösung II enthält neben Isopropanol 1 mg V_2O_5, 0,48 g Wasser und 20 mg Schwefelsäure.

Die Lösungen sind frisch zu bereiten.
Das Vanadin-Schwefelsäure-Reagenz DAB 6 wurde in seiner Zusammensetzung aus praktischen Gründen bewußt nicht verändert.

VI. 2. b. Messung der Farblösung von neutralem nativem Primulasaponin im BECKMAN DU-Spektralphotometer. Eichkurve.[+)]

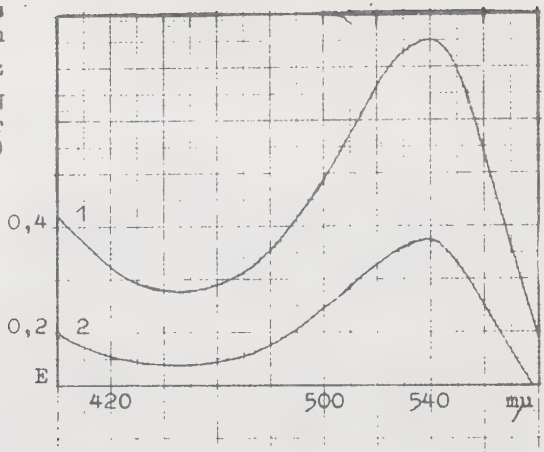
Nunmehr wurde die Bestimmung des Absorptionsmaximums von neutralem nativem Veris- und Elatiorsaponin mit dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Reagenz im BECKMAN DU-spektralphotometer durch Aufnahme zweier Spektren im Wellenbereich von 400 - 580 mμ vorgenommen.

Wellenlänge mμ	6 mg neutrales natives Primulasaponin		12 mg neutrales natives Primulasaponin	
	Extinktion (d = 1 cm)	log E	Extinktion (d = 1 cm)	log E
400	0,197	-0,705	0,416	-0,381
420	0,154	-0,812	0,322	-0,492
440	0,138	-0,860	0,282	-0,549
460	0,146	-0,836	0,294	-0,532
480	0,175	-0,757	0,356	-0,449
490	0,210	-0,678	0,416	-0,381
500	0,243	-0,614	0,493	-0,307
510	0,284	-0,547	0,566	-0,247
520	0,333	-0,478	0,667	-0,176
530	0,360	-0,444	0,725	-0,140
539	0,377	-0,424	0,755	-0,122
540	0,372	-0,429	0,751	-0,124
545	0,367	-0,435	0,733	-0,135
550	0,336	-0,447	0,688	-0,162
580	0,090	-1,046	0,190	-0,721

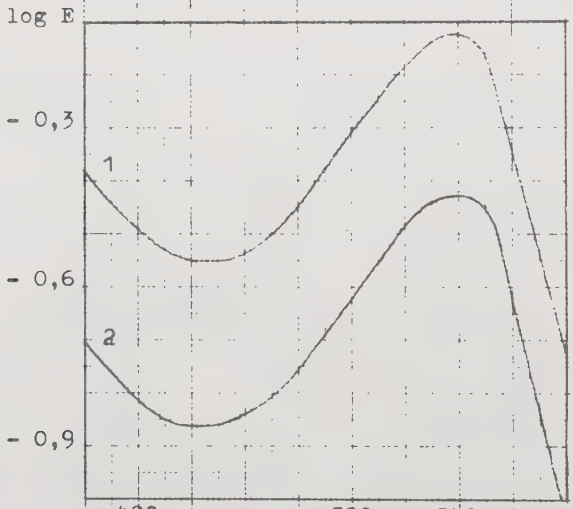
Eichkurve. Neutrales natives Primulasaponin.
Wellenlänge 530 mμ.
BECKMAN DU Spektralphotometer.

mg	Extinktion(d = 1 cm)
5	0,298
8	0,475
10	0,603
12	0,725
15	0,896

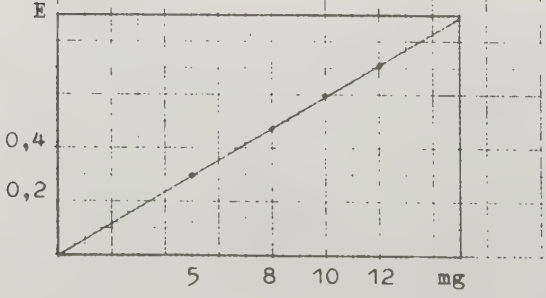
eutrales natives
Primulasaponin
+ 15 ml Reagenz
im BECKMAN
ektralphotometer
(d=1cm)



Farbkurven
1.) 12 mg
2.) 6 mg



"Typische
Farbkurven"
1.) 12 mg
2.) 6 mg



Eichkurve
530 mμ

Stabilitätsprüfung der Farblösung.

Filter 530 mμ.

5 mg neutrales natives Primulasaponin

nach Stunden bei 20° C im Dunkeln	1/2	1	1 3/4	2 1/2	3	5	26
E (d=1cm)	0,337	0,326	0,322	0,320	0,320	0,314	0,312

Die rote Lösung wird erst nach 1stündigem Erhitzen (65° C) in zerstreutem Tageslicht braun gefärbt.

Zusammenfassung

An Hand dieser Meßergebnisse wurde festgestellt, daß das Absorptionsmaximum der Farblösung bei 539 mμ liegt. Die Verwendung eines Kompensationsphotometers mit Spektralfiltern beeinträchtigt die Extinktionswerte nicht wesentlich, wenn das verwendete Filter einen optischen Filterschwerpunkt bei 530 mμ aufweist. Der Kurvenverlauf ist in diesem Bereich derart flach, daß die Messungen im Bereich dieser Wellenlänge die maximale Genauigkeit bei photometrischen Messungen gewährleistet.

VI. 2. c. Messung der Farblösung von neutralem nativem Primulasaponin im LEITZ-Kompensationsphotometer mit lichtelektrischer Anzeige. Standard-Eichkurve.

10 mg neutrales natives Primulasaponin

Filter	Extinktion (d = 1 cm)	log E
420	0,375	-0,426
445	0,275	-0,561
460	0,287	-0,541
495	0,405	-0,393
510	0,507	-0,295
530	0,626	-0,203
550	0,552	-0,258
570	0,241	-0,618

+) Die Messungen wurden im BECKMAN DU-Spektralphotometer des med.-chem. Labors der Rheuma-Heilstätte, Bad Bramstedt, durchgeführt.

15 mg neutrales natives Primulasaponin

Filter	Extinktion (d = 1 cm)	log E
420	0,564	-0,249
445	0,415	-0,382
460	0,431	-0,365
495	0,610	-0,215
510	0,762	-0,118
530	0,943	-0,026
550	0,828	-0,082
570	0,362	-0,441

Standard-Eichkurve
Filter 530
LEITZ-Kompensationsphotometer mit lichtelektrischer Anzeige

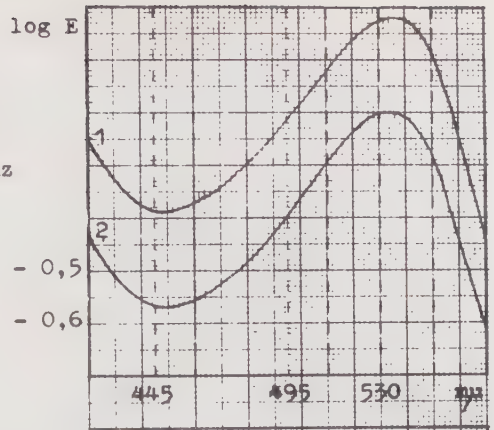
Neutrales natives Primulasaponin mg	Extinktion (d= 1 cm)
5	0,318
8	0,504
10	0,630
12	0,739
15	0,938

Alle im Verlauf der folgenden Gehaltsbestimmungen ermittelten Vergleichswerte lagen innerhalb einer Fehlergrenze von ± 2 %

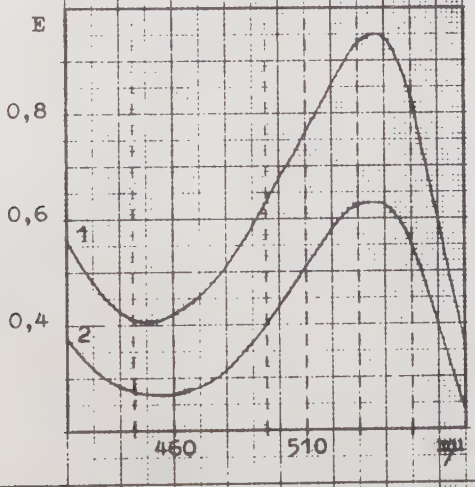
Primulasaponin von der Fa. BEIERSDORF & CO., Hamburg, 1/4 Stunde bei 105° C getrocknet, 3 Stdn. Vakuumexsikkator über Kieselgel (Blaugel):

10 mg Extinktion(d = 1 cm) = 0,573 entspr. 9,1 mg neutralem nativem Primula-Reinsaponin

neutrales
natives
Primulasaponin
+ 15 ml Reagenz
im LEITZ-
Kompensati-
onsphotome-
ter mit
lichtelek-
trischer
Anzeige

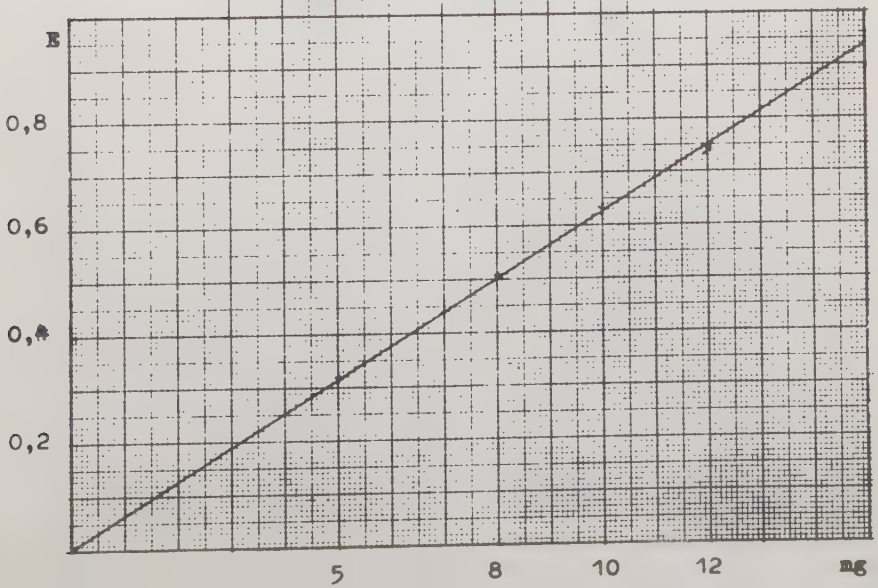


"Typische Farbkurven"
1.) 15 mg
2.) 10 mg



Farbkurven
1.) 15 mg
2.) 10 mg

Standard-
Eichkurve
mit Filter 530



VI. 2. d. Messung der Farblösung von saurem Primulasaponin im LEITZ-Kompensationsphotometer mit lichtelektrischer Anzeige.

Anschließend wurde saures Verissaponin mit dem unter VI.2.a. beschriebenen Farbreagenz versetzt und nach dem Zeitablauf von 3 Stunden im LEITZ-Kompensationsphotometer mit lichtelektrischer Anzeige gemessen.

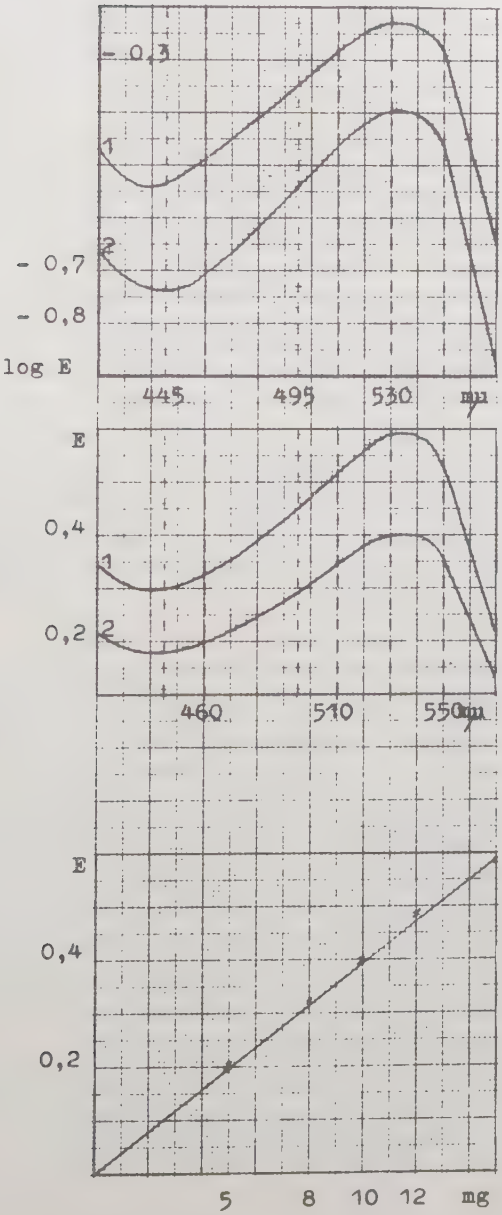
Filter	10 mg saures Verissaponin		15 mg saures Verissaponin	
	Extinktion (d = 1 cm)	log E	Extinktion (d = 1 cm)	log E
420	0,217	-0,665	0,343	-0,465
445	0,184	-0,735	0,296	-0,529
460	0,200	-0,699	0,332	-0,479
495	0,285	-0,545	0,436	-0,360
510	0,345	-0,462	0,518	-0,286
530	0,400	-0,398	0,591	-0,228
550	0,349	-0,457	0,523	-0,281
570	0,133	-0,876	0,226	-0,646

Eichkurve. Saures Verissaponin.
Filter 530
LEITZ-Kompensationsphotometer mit lichtelektrischer Anzeige

mg	Extinktion (d = 1 cm)
5	0,203
8	0,318
10	0,400
12	0,485
15	0,591

Von einer weiteren Auswertung dieser Werte wurde abgesehen, weil die nachträglich ermittelten Werte außerordentlich stark voneinander abwichen. Diese schlechten Ergebnisse wurden dadurch hervorgerufen, daß beim Trocknen des sauren Primulasaponins keine Gewichtskonstanz erzielt werden konnte.

Saures Primulasaponin
+ 15 ml Reagenz
im LEITZ-Kompensationsphotometer
mit lichtelektrischer Anzeige



"Typische Farbkurven"
1.) 15 mg
2.) 10 mg

Farbkurven
1.) 15 mg
2.) 10 mg

Eichkurve mit Filter 530

VI. 3. Isolierung des Farbstoffs

In den folgenden Untersuchungen wird versucht, Eigenschaften des in dem Reaktionsgemisch vorliegenden Farbstoffs festzustellen. Dazu wurde der rotgefärbten klaren Lösung von 10 mg Primulasaponin und 15 ml Reagenz (VI.2.a.) soviel Wasser hinzugesetzt, daß gerade eben eine rosa Trübung auftrat. Der abzentrifugierte Niederschlag wurde zweimal mit 1 ml Wasser und zweimal mit 1 ml 1/10n-Salzsäure gewaschen. Während der langsamen Trocknung des Niederschlags bei 20° C kristallisierten dunkelrote Schollen aus, die sich bei der Schmelzpunktbestimmung bei 135° C bräunten und bei 152° C ohne Intervall schmolzen. Wenn diese Farbsubstanz mit Methanol oder Isopropanol aufgenommen wurde, entstand eine farblose Lösung. Wurde die Substanz mit 25%iger Salzsäure aufgenommen, blieb ihre rote Färbung erhalten. Die Farbe ließ sich weder mit Äther noch mit Chloroform ausschütteln. Die saure Lösung wurde farblos, wenn sie alkalisiert wurde. Durch anschließendes Ansäuern nahm die Lösung ihre rote Farbe wieder an. Dieser Vorgang ließ sich beliebig oft wiederholen.

Eine Mikrountersuchung der Farbsubstanz auf Zucker mit der Natriummetaperjodat-Benzidin-Reaktion (Chromatographie MERCK, 1959) war erwartungsgemäß erfolglos. Im Dünnschichtchromatogramm wurde der rote Farbstoff neben Primulagenin aufgetragen. Während der Entwicklung mit dem Fließmittelgemisch Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2 v/v/v) verlor die Farbsubstanz ihre Farbe. Beide Stoffe wiesen aber nach einer Laufzeit von 3 1/2 Stunden und der Detektion mit der unter V.2.c. beschriebenen Farbreagenz-Sprühlösung gleiche Rf-Werte von 0,95 und eine gleich starke Rotfärbung auf.

Auf diese Weise wurde festgestellt, daß mit dem Primulasaponin-Farbtest eine Genin-Bestimmung gelungen ist, weil der Einfluß von Zuckern als Reaktionspartner ausgeschaltet werden kann (siehe auch VI.1.b.). Dieses ist bedeutsam, da über die Zusammensetzung der Zuckerkomponente des Primulasaponins noch keine völlige Klarheit herrscht (siehe II.3.).

VI. 4. Kolorimetrische Bestimmung des Primulasaponins in Droge und galenischen Zubereitungen

Kolorimetrie ist die Konzentrationsbestimmung von gefärbten Lösungen durch Farbmessung dieser Lösungen im Vergleich mit Standardlösungen (NEUWALD, 1960).

Bei der Untersuchung der unter VI.1.b. entwickelten Farblösung des Primulasaponins auf ihre optischen Eigenschaften konnte hinsichtlich des LAMBERT-BEERschen Proportionalitätsgesetzes festgestellt werden, daß der Extinktionskoeffizient von der Konzentration der Lösung im Bereich von 2 - 15 mg Saponin/15 ml Reagenz unabhängig blieb. Bei Mengen bis zu 15 mg lagen demnach die Eichpunkte im Diagramm innerhalb der Fehlergrenze für derartige Messungen auf einer Geraden, die durch den Nullpunkt des Diagramms ging, wenn die Farblösung mit der Blindlösung (VI.2.a.) kompensiert wurde.

An ein Verfahren für eine erfolgreiche Auswertung des Farbtestes zu einer quantitativen Primulasaponin-Bestimmung mußten folgende Forderungen gestellt werden:
1.) Das Primulasaponin muß auf chromatographischem Weg quantitativ rein isoliert werden, d.h. es muß vor allem von dem eventuell in der Zubereitung durch Hydrolyse in Freiheit gesetzten Genin getrennt werden, das von dem Farbreagenz in reiner Form und in glykosidischer Bindung in gleicher Weise angesprochen wird.
2.) Das Primulasaponin muß frei sein von den in der Droge

vorkommenden nicht saponinartigen Glykosiden. Diese ergeben mit Vanillin-rauchender Salzsäure, dem ersten Bestandteil des Farbreagenzes, im Gegensatz zum Saponin, das mit der Reagenzlösung 1 grün gefärbt wird, schon eine Rotfärbung und verursachen somit zu hohe Extinktionswerte für das Saponin.
3.) Alle Meßergebnisse müssen in Beziehung gesetzt werden zu einem stabilen Reinsaponin als Standardsubstanz. Darür eignet sich das saure Saponin nicht. Deshalb standen das neutrale native, salzartig gebundene Saponin und die aus dem sauren Saponin zu gewinnenden Natrium-, Kalium- und Ammoniumsalze zur Auswahl. In der vorliegenden Arbeit wurde auf das neutrale native Primulasaponin Bezug genommen, da es die Eigenschaften einer Standardsubstanz besitzt.
Der relativ hohe Schmelzpunkt des neutralen nativen Primulasaponins, seine gute Trocknungsmöglichkeit, die leichte Identifizierung durch die Verschiebung der Carbonylschwingung im IR-Spektrum von 6,15 nach 5,75 µ bei der Bildung von saurem Saponin, der leichte chromatographische Nachweis der Einheitlichkeit der Substanz und die Möglichkeit der Reindarstellung ohne einen großen apparativen Aufwand sprachen für die Verwendung als Standardsubstanz.

Da so die Voraussetzung für die Verwendung einer Standardkurve zur "feinkolorimetrischen Bestimmung" (NEUWALD, 1960) erfüllt war, konnte für die kolorimetrische Bestimmung entsprechend der USP XVI auf den Vergleich der Farbintensitäten, die durch eine Lösung der zu prüfenden Substanz und gleichzeitig durch eine Standardlösung hervorgerufen werden, verzichtet und die häufig überprüfte Primulasaponin-Standard-Eichkurve für das gleiche Instrument benutzt werden (VI.2.c.).

Trennung des Primulasaponins aus galenischen Primulazubereitungen.

Vorversuche. In Vorversuchen wurde das Saponin aus einer

Primulatinktur durch Zusatz einer Lösung, bestehend aus 3 ml 25%iger Salzsäure, 10 ml Eisessig und 87 ml Wasser, in einem Zentrifugierglas gefällt und abzentrifugiert. Das Saponin wurde nach dem Trocknen der Farbreaktion unterworfen. Die auf diese Weise vom Saponin nicht abtrennbaren Begleitstoffe beeinträchtigten jedoch die Meßergebnisse so stark, daß von einer weiteren Auswertung des Verfahrens abgesehen wurde. Die in den Primula-Wurzelauszügen anwesenden Glykoside Primverin und Primulaverin färben sich mit Vanillin-rauchender Salzsäure (Bestandteil Nr. 1 des Saponin-Farbreagenzes) schon rot. Bei dem oben angeführten Fällungsvorgang werden geringe Mengen von diesen Glykosiden immer mitgerissen.

Anschließend wurde versucht, einen primulahaltigen Fluidextrakt säulenchromatographisch zu verteilen. Ein einfaches Glasrohr (30cm Länge und 2 cm Durchmesser) wurde an einem Ende mit einem durchbohrten Korkstopfen versehen. Ein Wattebausch wurde in der Röhre bis zum Korkstopfen vorgeschoben und unter leichtem Klopfen der Röhre Aluminiumoxyd (sauer, Aktivitätsstufe I) eingefüllt, bis eine etwa 22 cm hohe Säule entstanden war. Diese wurde oben durch eine Filtrierpapierscheibe begrenzt. Danach wurde 3 ml Fluidextrakt auf die Säule gegeben. Sofort nach dem Einsickern des Extraktes wurde die Säule mit dem Fließmittel-Gemisch Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2 v/v/v) beschickt, bis die Fließmittelfront den Wattebausch erreicht hatte. Danach wurde die feuchte Aluminiumoxydsäule in einem Stück aus dem Glasrohr herausgestoßen bzw. durch leichten Luftdruck hinausgepreßt. Anschließend wurde die Säule in Scheibchen von 1/2 cm Dicke aufgeteilt, von denen 3 - 4 Stück durch Detektion mit Schwefelsäure eine deutliche Violettfärbung zeigten und, im Reagenzglas mit Wasser geschüttelt, im Gegensatz zu den übrigen Abschnitten der Säule, einen mindestens 5 Minuten andauernden Schaumring hervorriefen. Bei einer Säulenlänge von 22 cm befand sich das Primulasaponin in einer 9 - 11 cm vom Startpunkt entfernten Zone.
Bei weiteren Versuchen wurde die saponinhaltige Schicht der Aluminiumoxyd-Säule für sich getrocknet, in Filtrierpapier gehüllt und im Soxhlet mit Methanol der Extraktion unterworfen. Die Ergebnisse waren aber in quantitativer Hinsicht nicht zufriedenstellend, weil das Aluminiumoxyd das Saponin im Soxhlet auch nach 12stündigem Durchlauf von Methanol in beträchtlicher Menge festzuhalten vermochte.

Hauptversuch. An die Ergebnisse der papierchromatographischen Auftrennung von Primulasaponin anknüpfend wurden die bei der Saponinisolierung anfallenden methanolischen Auszüge(IV.1.) auf Chromatographierpapier (S. & S. 2045bM) aufgetragen, das ohne vorhergehende Imprägnierung mit Mengen von etwa 500 µg pro Fleck belastet werden konnte. Um in einem Fließverlauf Saponinmengen von 5 - 10 mg von

Begleitstoffen zu trennen, wurde die eventuell vorher eingeengte Lösung auf dem eben erwähnten Papierbogen nach dem "Strichverfahren" aufgetragen. Mit Ausnahme der 2 cm breiten Ränder wurde die auftragende Pipette langsam auf der Startlinie entlanggeführt, wobei das Lösungsmittel sich in einer 1,5 cm breiten Zone verflüchtigen sollte. Das konnte durch einen auf einem Stativ ruhenden Fön erreicht werden. So wurden jeweils zwei Papierchromatogramme in gleicher Weise belastet und parallel nach V.1.c. entwickelt, von denen dann aber nur eins detektiert wurde. Beide Papiere wurden anschließend nebeneinander gelegt und aus dem nicht mit AntimonIIIchlorid und Vanillin behandelten Papier die saponinhaltige Zone ausgeschnitten. Dieser Papierstreifen wurde zerteilt und in einem kleinen Soxhlet 10 Stunden mit Methanol der Extraktion unterworfen. Die methanolische Lösung wurde durch eine Glasfritte gegeben, das Methanol entfernt und der Rückstand 10 Minuten im Trockenschrank bei 105° C getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand dem Farbtest unterworfen. Als Blindlösung diente jeweils eine frisch bereitete Mischung der entsprechenden Mengen Reagenzlösung I und II (siehe VI.2.a.).

Ausführungsbeispiel für eine kolorimetrische Messung von Primulasaponin.

Bei der Gehaltsbestimmung von Wurzeln und Rhizomen von selbst geernteter Primula veris wurde z.B. von etwa 160 ml aus 54,50 g Droge (Sieb IV, Trocknung wie unter III.3.) gewonnenen Extrakt ausgegangen. Um das für die e r s c h ö p f e n d e Extraktion verwandte Methanol (siehe IV.1.) als Lösungsmittel für das z.T. ausgefallene Rohsaponin zu erhalten, wurde der methanolische Extrakt auf genau 200 ml mit Wasser verdünnt. Von dieser nun klaren Lösung wurde 0,30 ml auf den Chromatographierbogen aufgetragen. Nach der Auftrennung, Eluierung und Farbreaktion des Primulasaponins wurde die photometrische Messung entsprechend VI.2.c. durchgeführt. Das Ergebnis wurde unter Verwendung der dort aufgeführten Standard-Eichkurve des neutralen nativen Primulasaponins kolori-

metrisch ausgewertet. Das Ergebnis, 7,6 mg Primulasaponin, entsprach einem Saponingehalt der Verisdroge von 9,3 %.

Kolorimetrische Saponin-Bestimmung von Primuladroge.
Der Vergleich der Ergebnisse der kolorimetrischen Saponin-Bestimmung von Primuladroge und der Bestimmung ihres relativen Saponingehalts, berechnet aus dem Verhältnis der hämolytischen Wirksamkeit der Droge und des daraus isolierten Saponins (siehe IV.11.), zeigt, daß bei Primula veris, P. elatior und Handelsdroge B durch die hämolytischen Wirksamkeitsbestimmungen zu hohe Werte erhalten wurden.

Ergebnisse der kolorimetrischen Saponin-Bestimmung.

	%	%	%	Mittlerer Wert	%
veris	9,3	9,3	9,1	9,2 %	(9,5)
elatior	8,7	8,4	8,4	8,5 %	(12,1)
Handelsdroge B	8,5	9,0	8,6	8,7 %	(10,6)

In Klammern sind die Ergebnisse der Berechnung des relativen Saponingehalts der Droge (Seite 50), bezogen auf den mittleren hämolytischen Index von neutralem nativem Primulasaponin, aufgeführt. Abgesehen davon, daß diesen Werten, wie aus den Ausführungen der Abschnitte II.4., III.4. und IV.11. zu entnehmen ist, eine Fehlerbreite von ± 20 % eingeräumt werden muß, dürfte die Differenz zwischen den Hämolyse-Bestimmungen und den kolorimetrischen Bestimmungen auf der größeren hämolytischen Wirksamkeit des sauren Primulasaponins gegenüber seinem neutralem nativem Salz beruhen. Dies geht aus den Ergebnissen der präparativen Gewinnung des Primulasaponins hervor, wo aus Elatiordroge und aus Handelsdroge B mehr "Primulasäure" isoliert werden konnte.
Die außerordentliche Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Gehaltsbestimmungen der Primelwurzel und ihrer präparativen Ausbeuten an Saponin unter IV.1. wird allein durch das Aufarbeitungsverfahren des Rohsaponins zum Reinsaponin in dieser Arbeit hervorgerufen.

Fehlerbreite des kolorimetrischen Verfahrens. Um die Fehlerbreite des kolorimetrischen Verfahrens festzustellen, wurden unterschiedliche Mengen neutralen nativen Primulasaponins chromatographiert, eluiert und photometrisch bestimmt. Die Messungen wurden mit einem LEITZ-Kompensationsphotometer mit lichtelektrischer Anzeige (VI.2.c.) ausgeführt. Filter 530. Blindlösung siehe VI.2.a.

Natives neutrales Primulasaponin mg	E	gef. mg	E	gef. mg	durchschn. Substanzverlust %
3	0,181	2,87	0,179	2,84	4,8
5	0,298	4,83	0,296	4,70	4,7
8	0,485	7,70	0,488	7,75	3,4
10	0,610	9,85	0,617	9,75	2,0

Ergebnisse der kolorimetrischen Bestimmungen von saponinhaltigen Zubereitungen.

Stadatrat Primulae comp. A,

Bimazeration, 2mal 5 Tage, 2:10, Verisdroge(9,2% Saponin), Sieb IV: 1,1 % Primulasaponin

Stadatrat Primulae comp. B,

Perkolation in Stadatratorröhre, 2:10, STADA-Vorschrift, Verisdroge(9,2% Saponin), Sieb IV: 1,3 % Primulasaponin

Tinctura Primulae A,

nach MAZUREK, 1951, Mazeration, 2:10, 50%iger Alkohol, Verisdroge(9,2% Saponin), Sieb IV: 1,0 % Primulasaponin

Anm.: Theoretischer Saponingehalt der drei genannten Zubereitungen = 1,84 %.

Tussipect Hustentropfen(R) 0,35 % Primulasaponin

Anm.: Sämtliche Resultate beziehen sich auf das neutrale native Primulasaponin als Standardsubstanz.

VII. Galenische Untersuchungen

VII. 1. Haltbarkeitsprüfungen von Primulasaponin in galenischen Zubereitungen

Nachdem eine kolorimetrische Bestimmung des Primulasaponins in galenischen Zubereitungen möglich geworden war, wurde diese nun zur Prüfung der Stabilität des Saponins in galenischen Zubereitungen herangezogen. Die Untersuchung der verschiedenen galenischen Präparate ergab die in der folgenden Tabelle aufgeführten Ergebnisse im Vergleich mit Bestimmungen der hämolytischen Wirksamkeit.

	pH	kol.B. 1.a.	häm.B. 1.b.	kol.B. 2.a.	häm.B. 2.b.
Stadatrat Pr.comp.B. (VI.4.)	8,5	1,3%	1,5	1,3%	1,5
Tinctura Pr. A. (VI.4.)	5,7	1,0%	1,2	0,9%	1,4
Tussipect Hustentropfen(R)	8,7	0,35%	---	0,35%	---
Guakalin-Tropfen	9,2	0,2%	---	0,2%	---

Bezugssubstanz = neutrales natives Primulasaponin

Zur Tabelle: 1.a. Gehaltsbestimmung des frisch bereiteten, bzw. aus dem Handel bezogenen Präparates

1.b. Ph.-Helv.-Einheiten im g

2.a. Kolorimetrische Bestimmung nach 6 Monaten

2.b. Ph.-Helv.-Einheiten im g nach 6 Monaten

Die papierchromatographische Untersuchung von Guakalinsaft ergab (halbquantitativ) einen über 6 Monate konstant bleibenden Primulasaponin-Gehalt von 0,04 %.

Die Haltbarkeitsprüfung der Tinctura Primulae zeigte, daß eine Bestimmung der hämolytischen Wirksamkeit galenischer Präparate falsche Schlußfolgerungen hinsichtlich des Saponingehalts zuläßt. FINHOLT, 1957, hat gezeigt, daß sauer reagierende primulasaponinhaltige Lösungen und galenische Zubereitungen während verschiedener Lagerungs- oder Wärmebehandlungszeiten ihre hämolytische Wirksamkeit zunächst erhöhen und anschließend durch Zuckerabspaltung verringern können. Diese Beobachtung wird nicht zuletzt durch die Tatsache erklärlich, daß Primulasaponin seine hämolytische Wirksamkeit verändern kann (IV.11.).
Im übrigen zeigen die verschiedenen galenischen Zubereitungen eine bemerkenswert gute Stabilität innerhalb von 6 Monaten.
Für die Stabilität des Primulasaponins in flüssigen Zubereitungen ist deshalb ein pH von etwa 8,5 - 9,5 erforderlich. Eine Gelbildung in den Zubereitungen, für die A.BÜCHI, J.BÜCHI und DOLDER, 1950, das Saponin verantwortlich machen, konnte nur bei neutralen und sauren Saponinlösungen beobachtet werden. Es wird deshalb

angenommen, daß nur die "Saponinsäure" zur Gelbildung befähigt ist.

VII. 2. Herstellung eines Primula-Rohsaponins

Es wurde bereits erwähnt, daß die Ph.Helv.V eine Darstellungsvorschrift für einen neutralisierten Primula-Trockenextrakt mit Standardeigenschaft in Bezug auf die hämolytische Wirksamkeit (MÜHLEMANN und SCHEIDEGGER, 1947) enthält. Die großen Vorteile bei der Verwendung eines derartigen Trockenextraktes zur Herstellung von Extraktlösungen und Hustentropfen und -säften gegenüber den "trüben, unappetitlichen Suspensionen, die mit der Zeit deponieren und unangenehm zu riechen beginnen, wie sie Dekokte und Infuse bilden", zeigte HEIZ, 1948, auf und wurden von A.BÜCHI, J.BÜCHI und DOLDER, 1950, aus dem Pharmazeutischen Institut der ETH, Zürich, bestätigt.

Es soll hier noch kurz ein Protokoll einer eigenen Trokkenextraktbereitung nach der Darstellungsvorschrift der Ph.Helv.V, Suppl.II, vorangestellt werden.

50,0 g Radix Primulae (Verisdroge, H.I. 2950)
Sieb IV, kolorim.best.Gehalt an Primulasaponin 9,2 %
H.Z. 147500 = 100 %
(H.Z.=H.I. x g Droge)
+ 50 g Seesand
Extraktionsmittel: 50 Gew.% C_2H_5OH
Lösungsmittel,
mit dem die Trockenrückstände des Vorlaufs, Nachlaufs und der von der Droge anschl.abgepreßten Flüssigk. aufgenommen wurden: 60 Gew.% C_2H_5OH

0,8 g Defäkationsrückstand
9,6 g Trockenrückstand, nicht eingestellt
(H.I. 9350) H.Z. 89760 = 60,8%

Hämolytische Wirksamkeit 37,4 Ph.-Helv.-E.im g
0,65 ml Prüflösung (3,5 cg / 100ml)
hämolysierte 1 ml ES.
0,65 ml = 228 µg Extrakt
Neutrales natives Verissaponin
H.I. 30600
Relativer Saponingehalt des Extraktes = 30,4%
(Berechnet aus dem Verhältnis der H.Is. des Extr. und des nativen Saponins)

Kolorimetrische Gehaltsbestimmung
des Primula-Trockenextraktes
(30 mg Extr. = E 0,610 = 9,8 mg Saponin)

= 32,6 % Primulasaponin

Die Ausbeute an Primulasaponin betrug somit(kolorimetrisch bestimmt)

68,0 %.

Löslichkeit des Trockenextraktes
1 T. Extrakt in 10 T. Weingeist (30%) klar löslich. Gelbildung wurde auch in wässrigen, trüben Lösungen (1+19) innerhalb von 10 Tagen nicht beobachtet.

Es war festgestellt worden, daß der Wirkstoff, das neutrale native und das saure Primulasaponin, im Soxhlet mit Methanol erschöpfend extrahiert werden kann, während nach der Darstellungsvorschrift des Trockenextraktes der Ph. Helv.V die Primelwurzel im eigenen Versuch nur zu 68,0 % ausgebeutet werden konnte. Weitere Vorteile, die durch die Verwendung von Methanol als Extraktionsmittel entstehen, sind folgende:

Keine lästige Schaumbildung beim Eindampfen des wasserfreien Extraktes, die nur mit einem Schaumzerstörer, z.B. Silikonemulsion (KOMMENTAR Ph.Helv. Suppl.I u. II.Seite 100), wirksam eingedämmt werden kann,

keine Gelbildung bei der Aufarbeitung des zunächst noch flüssigen, wasserfreien Extraktes,

kein Verstopfen der Drogensäule, wie es beim zeitraubenden Perkolationsverfahren bei Gegenwart von Wasser durch Quellung der fein gemahlenen Droge leicht vorkommt.

Anschließend wird nun versucht, unter Ausnutzung der in dieser Arbeit gesammelten Erfahrungen mit Primulasaponin zum Vergleich mit den Darstellungsvorschriften für Trokkenextrakte des DAB 6 und der Ph.Helv.V auf eine wesentlich vereinfachte und weniger zeitraubendere Weise ein Primulawirkstoffkonzentrat herzustellen.

Herstellungsverfahren

50 g Droge (Sieb IV), genau gewogen, wurde zunächst mit 250 ml Aethylmethylketon und anschließend mit 250 ml

Methanol im Soxhlet extrahiert(siehe IV.1.). Der über dem schon ausgefallenen Rohsaponin stehende methanolische Extrakt wurde mit 1 g Tierkohle kräftig geschüttelt, kohlefrei filtriert und mit 3 - 6 Tropfen n-alkoholischer Natronlauge auf ein pH von 8 eingestellt (Indikatorpapier; der Laugenverbrauch richtet sich nach dem Alter der verwandten Droge). Anschließend wird der Extrakt mit dem zunächst schon ausgefallenen Rohsaponin wieder vereinigt, mit dem Magnetrührer in Bewegung gehalten und dabei auf dem Wasserbad bei einer 50° C nicht überschreitenden Temperatur von dem Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird dann auf demselben Wasserbad im Hochvakuum bei einem Endvakuumwert von etwa 0,05 Torr (mit einer rotierenden, zweistufigen LEYBOLD-Gasballastpumpe, Modell D2) 1 1/2 Stunden nachgetrocknet.
Auf diese Weise erhält man ein relativ gut wasserlösliches Primula-Konzentrat, das man am besten als ein aus der Droge erschöpfend extrahiertes Rohsaponin in Salzform bezeichnet.

Ausbeute in einem Fall: Aus 50,2 g Droge wurde 5,0 g Rohsaponin gewonnen. Saponingehalt der Droge: 9,2 %. Theoretischer Saponingehalt des Rohsaponins: 92 %.

Für eine annähernde Gehaltsbestimmung wurde das Rohsaponin in wässriger Lösung in ansteigenden Mengen zwischen 30 und 70 µg gegen 35 und 65 µg neutrales natives Primulasaponin papierchromatographisch entwickelt und detektiert. Dabei wurde an Hand der Farbintensität der Farbflecke visuell festgestellt, daß der Saponingehalt des Rohsaponins der Theorie nachkam.

Die kolorimetrische Bestimmung ergab einen Saponingehalt von 92 %.
Um 5,0 g des Primula-Rohsaponins auf einen Gehalt von 90 % Reinsaponin einzustellen, wurde 0,11 g Milchzucker zur Verreibung hinzugegeben.

Löslichkeit.1 T. eingestelltes Rohsaponin ist in 10 T. Weingeist (30%) klar löslich. Gelbildung wurde auch in wässrigen, klaren Lösungen (1+49) innerhalb von 10 Tagen bei 22° C nicht beobachtet.

VII. 3. Abänderungsvorschläge für die Herstellung von Primulazubereitungen unter Berücksichtigung eines standardisierten Primula-Rohsaponins

Zur Überwachung der Dosierungsgenauigkeit von Primulasaponin in den galenischen Zubereitungen wird vorgeschlagen, an Stelle des bisherigen Extraktes auf Grund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse ein Primula-Rohsaponin zu verwenden. Es wurde festgestellt, daß das nach dem Perkolationsverfahren (aus Verisdroge mit 9,2 % Primulasaponin) hergestellte Extractum Primulae fluidum (Stadatrat Primulae comp.) einen Saponingehalt von 1,3 % aufwies. Es wurde bei den folgenden Rezeptvorschlägen für die Defektur ein Primula-Rohsaponin mit einem Reinsaponin-Gehalt von 90 % vorausgesetzt.

Vorschlag für Hustentropfen

Ol. Anisi	0,1 g
Ol. Foeniculi	0,2
Camphora	0,05
Mentholum	0,1
Spiritus	1,0
Saccharin. solub.	0,125
Ephedrin.hydrochl.	1,0
Guajacol-Glycerinäther	7,5
Extr.Thymi comp.	28,2
Standard.Primula-Rohsap.(90%ig)	0,2
Spiritus dil	21,0
Glycerinum	40,0

Vorschlag für Hustensaft

Guajacol-Glycerinäther	1,0 g
Extractum Thymi cp.	3,0
Aristarom Cacao(R)	0,24
Sirup.simpl.	92,5
Spirit.Foeniculi 1%ig	1,5
Standard.Primula-Rohsap.(90%ig)	0,04
Spiritus dil.	1,6

Den Rezeptvorschlägen liegen die STADA-Vorschriften aus den Erg.-Blättern des Anhangs vom Januar 1955 zugrunde.

VIII. Zusammenfassung

Die Droge Radix Primulae Erg.B.6., deren expectorierende Wirkung auf ihrem Gehalt an Saponin beruht, hat für die pharmazeutische Praxis eine derartige Bedeutung bekommen, daß sie wahrscheinlich in den Drogenteil des DAB 7 aufgenommen werden wird. Eine Vorbedingung dafür aber ist die Möglichkeit einer Standardisierung der Droge. Die biologischen Wertbestimmungen, wie auch die Hämolysebestimmung, weisen viele Fehlerquellen und eine große Fehlerbreite auf. Eine chemische quantitative Methode der Saponinbestimmung in der Droge, Drogenzubereitungen und Gemischen von reinen Saponinlösungen und Extrakten war bisher nicht bekannt. Das gilt ganz allgemein für alle Saponine.
In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, Grundlagen für eine kolorimetrische Saponinbestimmung für die Primelwurzel und alle Primulazubereitungen auszuarbeiten, um primulahaltige Arzneimittel von wohldefinierter Zusammensetzung und guter Haltbarkeit bereiten zu können.

Es wurden selbst geerntete Wurzeln und Rhizome von Primula veris (etwa 10 kg) und Primula elatior (etwa 5 kg) getrocknet und pulverisiert.
Die morphologischen und histologischen Untersuchungen zeigten, daß das selbst geerntete Material und die aus dem Handel bezogene Droge Radix Primulae(Muster B) den Anforderungen des Erg.B.6. entsprachen. Das Primulasaponin wurde bei der Betrachtung von Rhizom- und Wurzelschnitten durch die Anfärbung mit einem Triterpenreagenz nach BRIESKORN und BRINER, 1953, (Chlorsulfonsäure + Sesolvan NK$^{(R)}$) und durch die hämolytische Aktivität im Blutgelatinepräparat nach FISCHER, 1952, hauptsächlich als Lösungsbestandteil des Zellsaftes der Xyleme erkannt.
Das selbst geerntete und das aus dem Handel bezogene Drogenmaterial wurde nach der Ph.Dan.48 auf den Aschegehalt untersucht, der zwischen 5,2 und 23,6 % schwankte, und nach der Ph.Helv.V auf die hämolytische Wirksamkeit geprüft, die, auf Saponin-Standard Ph.Helv.V bezogen,

11,8 bis 15,2 Ph.-Helv.-Einheiten/Gramm betrug. Bei der Isolierung des Primulasaponins, das bisher ausschließlich in Form der freien Saponinsäure diskutiert worden war, wurde bewußt auf den von verschiedenen Autoren verwendeten wäßrigen Ammoniak als Extraktionsmittel verzichtet. Nach einer Vorextrahierung mit Aethylmethylketon wurde durch eine Extraktion mit Methanol ein salzartig gebundenes Primulasaponin gewonnen. Die präparativen Ausbeuten an neutralem nativem Reinsaponin und an freier Primulasäure betrugen 1 - 2 %. Aus älterer Droge konnte neben saurem nur sehr wenig neutrales Saponin isoliert werden. Das neutrale native, wasserlösliche Primulasaponin ist ein kaliumhaltiges Salz, das im Gegensatz zum sauren, gelfreudigen Saponin beständig und nur sehr schwach hygroskopisch ist. Neutrales natives Elatior- und Verissaponin zeigte einen Schmelzpunkt bei 270° -275° C, saures Verissaponin (215°-220° C) hatte einen etwas niedrigeren Schmelzpunkt als das entsprechende Elatiorsaponin (225°-230° C), was auf die geringe Stabilität der freien Saponine zurückgeführt wird.

Die Mischprobe d r durch saure hydrolytische Spaltung der Saponine erhaltenen freien Genine (von Primula veris und P.elatior) gab keine Schmelzpunktserniedrigung.

Die UV-Reflexionsmessung (210-350 mμ) von nativem Verissaponin im BECKMAN-DK-Gerät mit Ulbricht-Kugel ergab keine Absorption.

Hingegen erwies sich das Infrarot-Spektrum im Wellenbereich von 2 - 15 μ für die Identifizierung von Primulasaponin als besonders geeignet. Veris- und Elatiorsaponin verhielten sich praktisch gleich. Das jeweilige saure Saponin zeigte eine Carbonylschwingung bei 5,75 μ. Diese Bande wurde bei Salzbildung, so beim neutralen nativen Primulasaponin, gänzlich nach 6,15 μ in den Bereich der C=C-Valenzschwingung verschoben und damit maskiert.

Die Bestimmung der hämolytischen Wirksamkeit von Primulasaponin ergab, daß das native Saponinsalz ungefähr 25 % hämolytisch wirksamer ist als der Saponin-Standard Ph.Helv.V. Da aus älterer Droge im Gegensatz zu frisch aufgearbeiteter Primelwurzel außer einer sehr geringen Menge neutralen Saponins zum überwiegenden Teil die freie Primulasäure isoliert wurde, und das freie Saponin

gegenüber dem salzartig gebundenen Saponin eine gewisse unterschiedliche hämolytische Wirksamkeit zeigt, erweist sich eine Wertbestimmung durch Verfahren der Bestimmung der hämolytischen Wirksamkeit bzw. der hämolytischen Indizes, denen überdies ein versuchstechnischer und methodischer Fehler von ± 10 % anhaften, problematisch. Eine Auftrennung der sauren und neutralen Bestandteile in der Droge gelang nur präparativ.

Für die Identifizierung von Primulasaponin waren sowohl die Papier- als auch die Dünnschichtchromatographie geeignet. So wurden natives Veris- und Elatiorsaponin, Zwischenprodukte des Isolierungsgangs, Frischpflanzenauszüge, Arzneispezialitäten und andere galenische Zubereitungen mit dem Fließmittelgemisch Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2 v/v/v) chromatographiert. Der Vorzug der Dünnschichtmethode beruhte auf einem besseren Trenneffekt. Die Rf-Werte für neutrales natives und saures Saponin sind erwartungsgemäß gleich, sie schwankten je nach Art des Verfahrens zwischen 0,45 und 0,57.

Das Baden des Papierchromatogramms in einer Blutkörperchenaufschwemmung erlaubte verständlicherweise nur eine unspezifische Detektion des Primulasaponins. Mit einer Lösung von 1 Teil Vanillin und 2 Teilen Antimon(III)chlorid in 47 Teilen Chloroform konnte jedoch eine für das Primulasaponin spezifische Detektion durch die Ausbildung leuchtend rot-violetter Farbflecke erzielt werden. Auf diese Weise wurde 10 µg Primulasaponin von den chromatographischen Verfahren noch sehr gut angesprochen. Es konnte gezeigt werden, daß das Primulasaponin in sauer reagierenden Frischpflanzenauszügen teilweise oder gänzlich, anscheinend durch hydrolytische Einflüsse, zersetzt wird. In einer Urtinktur Primula veris HAB 2 wurde nur noch das hämolytisch unwirksame, freie Primulagenin neben den abgespaltenen Zuckern angetroffen.

Die Versuche, einen für Primulasaponin charakteristischen, photometrisch auswertbaren Farbtest zu erarbeiten, verliefen erfolgreich. 2 - 15 mg Primulasaponin ergab mit

dem Reagenz, das sich aus 5 ml Lösung I (1,20 Vanillin, rauchende Salzsäure zu 50 ml) und 10 ml Lösung II (5,0 g Vanadin-Schwefelsäure-Reagenz DAB 6, Isopropanol zu 100 ml), nach 10 Minuten hinzugefügt, zusammensetzt, eine stabile rote Farblösung, die bei 539 mμ ihr Absorptionsmaximum aufweist und sich in diesem Konzentrationsbereich hinsichtlich des Proportionalitätsgesetzes nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz verhält.

Durch papierchromatographische Trennung wurde Primulasaponin aus Drogen und Primulazubereitungen im Strichverfahren quantitativ isoliert, vom Papier mit Methanol eluiert und kolorimetrisch bestimmt. Die selbst geernteten und aufbereiteten Primelwurzeln von Primula veris und Primula elatior enthielten 9,2 bzw. 8,5 % Saponin, auf neutrales natives Reinsaponin bezogen.

Die Untersuchung der Haltbarkeit von Primulasaponin bestätigte die Beobachtungen von FINHOLT, 1957.

Abschließend wurde ein Verfahren zur Herstellung eines wasserlöslichen Primula-Rohsaponins beschrieben, das von einer erschöpfenden methanolischen Extraktion des Saponins aus der Droge ausgeht. Damit wird die Ausbeute der Droge gegenüber den herkömmlichen, zeitraubenderen Verfahren des DAB 6 und der Ph.Helv.V, die nur eine 60-70%ige Saponinausbeute gewähren, wesentlich verbessert. Das Rohsaponin wurde mit Milchzucker auf einen Reinsaponin-Gehalt von 90% eingestellt. Es wurde der Vorschlag gemacht, bei der Herstellung von galenischen Primulazubereitungen an Stelle des bisher üblichen Extraktes ein standardisiertes Primula-Rohsaponin zu verwenden.

IX. Häufig benutzte Präparate, Reagenzien und Lösungsmittel

Aether DAB 6
Aethylmethylketon, reinst (6014), siehe auch USP XVI, 1009
Aluminiumoxyd "sauer" und "annähernd neutral" WOELM
AntimonIIIchlorid p.a. (7838)
Benzidin p.a. (1762)
Bronchialtee Solubifix(R) Fa. HEUMANN
n-Butylalkohol f.d.Chromatographie (9628)
Chloroform DAB 6 (2431)
Chlorsulfonsäure, rein (220)
Chromatographierbogen SCHLEICHER & SCHULL 2043a, 2043bMgl, 2045bM
Dinatriumhydrogenphosphat nach SØRENSEN (6580)
Eisessig 1,055-1,058 p.a. (60)
D-Glukuronsäure DR.TH.SCHUCHARDT
Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator (Blaugel) (1925)
Knochenkohle, gepulvert (2180)
Ionenaustauscher I (4765)
Isopropanol f.d.Chromatographie (9634)
Kaliumdihydrogenphosphat nach SØRENSEN (4873)
Kohlensäureschnee Fa. LANGNESE Eiscreme-Fabrik, Hamburg
Methanol p.a. (6009) und Erg.B.6. (6006)
Natriummetaperjodat (6597)
Primula veris Urtinktur Fa. MADAUS und Fa. SCHWABE
Primula obconica Urtinktur Fa. SCHWABE
Salzsäure, rauchend 1,19 p.a. (317) und 25%ig DAB 6 (312)
Schwefelsäure 1,84 p.a. (731)
Sesolvan NK(R) BASF
Tetranitromethan, rein p.a. FLUKA
Tussipect Hustentropfen(R) Fa. BEIERSDORF, Hamburg
Vanadin-Schwefelsäure-Reagenz DAB 6 (8501)
Vanillin DAB 6 (8510)
Zinkchlorid DAB 6 (8815)

In Klammern sind die Artikel-Nummern der E.MERCK AG angegeben.

Handelsdrogen-Muster:

Radix Primulae Erg.B.6. von der Fa. CAESAR u. LORETZ KG Michelstadt i.Odenw.

A plv.gross.
B conc.

X. Literaturverzeichnis

Asahina, Y. und Kagitani, M. B. 67, 804, 1934

Bischof, B. und Jeger, O. Helv.chim.Acta 31, 2, 1760, 1948

Bischof, B., Jeger, O. und Ruzicka, L. Helv.chim.Acta 32, 1911, 1949

Boedecker, F. Patentschrift vom Deutschen Patentamt Nr.916664,Klasse 30h,Gruppe 203, 1954

Böhmig, F. Über die Gattung Primula, Anbau, Züchtung und Pflege. Neumann Verlag, Radebeul 1954

Brandt, W. Pharmaz.Ztg. 69, 204, 1924

Brieskorn, C.H. und Briner, M. Pharm.Acta Helv. 28,139,1953

Brieskorn, C.H. und Capuano, L. B. 86, 866, 1953

Brieskorn, C.H. und Herrig. B. 10, 485, 1959

British Pharmaceutical Codex, London 1959

Büchi, J., Büchi, A. und Dolder, R. Pharm.Acta Helv. 25, 339, 1950

Büchi, J. und Dolder, R. Pharm.Acta Helv. 25, 179-188, 1950

Butz, W. Pharm.Acta Helv. 20, 296, 1945

Chromatographie, E.MERCK AG Darmstadt 1959 (u.a. S.137)

Codex Français, Paris. 7. 1949

Czerwonka, H. Dtsch.Med.Wschr. 55, 1972, 1929

Deutsches Arzneibuch, Berlin. 6.Ausgabe 1926

Deutsches Wörterbuch von J. und W. Grimm, Leipzig 4.II.1352, 1877; 9.860, 1899

Dispensatory of the United States of America XXIV, 1557,1947

Engfeldt, O. Svensk farm.tskr. 25, 31-33, 1921 zit.u.a. L.Kofler Arch.Pharmaz.262, 318, 1924

Engler, A. - Prantl, K. Die natürlichen Pflanzenfamilien Verlag v.Engelmann, Leipzig 1891 IV. 1.Abt. S. 98 ff.

Ergänzungsbuch zur 6. Ausgabe des Deutschen Arzneibuches, Berlin 1941

Extra Pharmacopoeia, The, London, The Ph. Press, vol.I 24, 1385, 1958

Finholt, P. Medd.Norsk Farm.Selsk.,Oslo, 4/5,142-157, 1955

Finholt, P. Saponiner og saponinholdige galeniske preparater A.W. Brøggers Boktrykkeri, Oslo 1957

Finholt, P. Pharmac.Weekblad Amsterdam 93, 105ff., 1958

Finholt, P. Medd.Norsk Farm.Selsk., Oslo 21, 37ff., 1959

Fischer, R. Praktikum der Pharmakognosie, Springer Verlag Wien 3. 1952

Flamm, S., Kroeber, L. und Seel, H. Rezeptbuch der Pflanzenkunde Hippokrates-Verlag Stuttgart 1944

Fuchs, L. und Koch, J. Scientia 18, 121-135, 1950

Gaisböck, F. Klin.Wschr. 3, 747, 1924

Gerlach, H. Planta Medica 6, 448, 1958

Gilg, E., Brandt, W. und Schürhoff, P.N. Lehrbuch der Pharmakognosie 4. 332, 1927

Goris, A. und Ducher, J. zit. von Grimme, Pharm.Zhlle. 62, 691, 1921

Goris, A., Mascré, M. und Vischniac, Ch. zit. Chem.Zbl. Ia, 310, 1913

Goris, A.,und Vischniac, Ch. zit. Chem.Zbl. I, 469, 1920

Grimme, Cl. Pharmaz.Zhlle 62, 691, 1921

Gstirner, F. Prüfung und Verarbeitung von Arzneidrogen Springer Verlag I, 46ff., 1955

Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis
1.Erg.B., 62, 1949
2.Erg.B., 189ff., 1958

Heeger, E.F. Pharmazie, 2, 41, 1951

Hegi, G. Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Band V, 3., 1725, 1739, 1746 ff.

Heinichens Lateinisch-deutsches Schulwörterbuch,Teubner Vlg. 187 u. 460, 1931

Heiz, R. Pharm.Acta Helv. 23, 217, 1948

Henderson, V.E. und Taylor, A.H. J.Pharmak.exper.Ther. 2, 152, 1910

Herre, E. Arch.exper.Path.u.Pharmakol. 184, 710, 1937

Hildebrandt, F. Münch,med.Wschr. 1999, 1936

Hirschsohn zit. von Steiner und Holtzem in Mod.Meth.d. Pflanzenanalyse III, 64, 1955

Homöopathisches Arzneibuch 2. Berlin.333, 1949

Hünefeld, Greifswald. J.prakt.Chem. Leipzig 7, 57, 1836 und 16, 111, 1839 in d.Bibl.d.Chem. Staatsinstituts, Hamburg, zug.

Hummel, K. Herkunft und Geschichte der pflanzlichen Drogen, Wiss.Verlagsges.Stuttgart 1957

Jaretzky, R. Lehrbuch der Pharmakognosie 2., 1949

Joachimowitz, R. Klin.Wschr. 28, 606, 1920

Jung, F. und Wirth, L. Arch.exper.Path.u.Pharmakol. 210, 328ff., 1950

Karma, H. und v.Schantz, M. Scientia 27, 6ff., 1959

Klein, G. Handbuch d.Pflanzenanalyse Springer Verlag III., 2., 1112, 1932

Kobert, R. Arch.exper.Path.u.Pharmakol. 22, 259, 1887

Kobert, R. Abderhaldens biochem.Handlexikon 7, 159, 1912 zit.Kofler, Arch.Pharmaz. 262, 318, 1924

Kofler, L. Arch.Pharmaz. 262, 318, 1924

Kofler, L. Die Saponine,Springer-Verlag, Wien. 231, 1927

Kofler, L. Arch.Pharmaz. 266, 479ff., 1928

Kofler, L. Mikromethoden, Universitätsverlag Wagner, Innsbruck 1948

Kofler, L. und Adam, Ph.A. Arch.Pharmaz. 265, 648, 1927

Kofler, L., Kollert, V. und Grill, H. und Susani, O. Z.f.d.ges.exper.Med. 45,682,1925 u. 49,522,1926

Kommentar zur Ph.Helv.V, Suppl.I und II. Zürich 1956 Seiten 99 u. 269

Korte, F. und Weitkamp, H. Angew.Chemie 14, 434-437,1958

Angew.Chemie 14, 455-456,1959
Anschrift: Schloß Birlinghoven über Siegburg

Kortüm, G. und Vogel, J. Angew.Chemie 14, 451-455, 1959

Kranen-Fiedler, U. Sonderband 90 Jahre W.Schwabe. S.68 1956

Kroeber, L. Pharm.Zhlle 63, 574, 1922

Kroeber, L. Das neuzeitliche Kräuterbuch 3. Hippokrates-Verlag S.323, 1937

Lang, W. Planta Medica 3, 83, 1953

Liebermann, C. B. 18, 1804, 1885

Lindner, J., Figala, N. und Hager, J. B.67, 1641, 1934

Lingelsheim, A.V. Heil- u. Gewürzpflanzen 10, 49 u.113, 1927

Margot, A. und Reichstein, T. Pharm.Acta Helv. 17, 113, 1942

Masson, G. Bull.d.Sciences Pharmakol. 18,699,1911 zit.von Kofler Arch.Pharmaz.262,318,1924

Mazurek, I. Arch.Pharmaz. 284, 19, 1951

Merck Index USA, Merck & Co. 7. 852, 1960

Mevius, W. Miehes Taschenbuch der Botanik 17. I. 1958

Møller, K.O. Pharmakologie 1953 S.395

Mühlemann, H. und Scheidegger, W. Pharm.Acta Helv. 22, 405, 1947

Mutschler, L. J.Liebigs Ann.d.Chem. 185, 214, 1877

National Formulary of USA, XX, Washington 1955

Neuwald, F. Planta Medica 3, 68, 1953

Neuwald, F. LEITZ Mitteilungen für Wissensch.u.Techn. I.5., 151-153, 1960

Neuwald, F. und Overlach, K. Arch.Pharmaz. 293,753,1960

Pharmacopoea Danica 9. København 1948 I.,90-92

Pharmacopoea Helvetica V, 1933. Suppl.I und II,1948 und 1955. Kommentar 1956

Pharmacopoeia of Great Britain XX, 1958

Pharmacopoeia USA XVI, 1960 Washington

Reichert, B. Dtsch.Apoth.Ztg. 51, 621, 1937

Rosenthaler, L. Z.anal.Chemie 44, 292, 1902

Rosenthaler, L. B. 15, 178, 1905

Ruhkopf, H. und Mohs, P. B. 69, 1522, 1936

Rundshagen, H. Beitr.Klin.Tuberk. 84, 22, 1934

Runge, P.A. Pharm.Acta Helv. 27, 315, 1952

Runge, P.A. Pharmazie 10, 362, 1955

Ruzicka, L. Liebigs Ann.Chem. 471, 25, 1929

Sakač, R. Chem.Zentralbl. 3653, 1956

Salkowski, E. Hoppe Seylers Z. 57, 521, 1908

Schindler, H. Inhaltsstoffe und Prüfungsmethoden homöopath. verwend.Heilpflanzen Ed.Cantor 1955 S.156

Schumann, G. Arch.Pharmaz. 279, 67, 1941

Seel, H. Planta Medica 3, 79, 1953

STADA-Vorschriften. Erg.-Blätter Anhang Jan.1955

Stahl, E. Arbeitsvorschriften für die Dünnschichtchromatographie Fa.C.Desaga Heidelberg 1959

Steiner, M. und Holtzem, H. Triterpene und Triterpensaponine in Mod.Meth.d.Pflanzenanalyse K.Paech-M.V.Tracey Springer Verlag III.,65ff. 1955

Svenske Farmakopén XI, Stockholm 1946

Tomczyk, H. Diss.Pharm.Polska Akad.Nauk 9, 1:25/34, 1957 ref. Pharmaz.Jahrbuch 1957 S.423

Tschesche, R. und Heesch, A. B. 85, 1067, 1952

Tschugajew ref. Chem.Ztg. 24, 542, 1900

Ulzer, F. und Haas, W. ref. von Margot und Reichstein, Pharm.Acta Helv. 17, 113, 1942

US-Dispensatory siehe Dispensatory of USA

Vollmer, H. Münch.med.Wschr. 81, 1840, 1934

Wasicky, R. Pharmaz.Post 53, 202, 1920

zit.nach Kofler, Arch.Pharmaz.266, 479ff.,1928

Winkler, W. und Patt, P. Naturw. 4, 83, 1960 und Arzneimittelforsch. 4, 274, 1960

Woyts, Joh.Jacob Medico Physicum, Leipzig 1751

Yanagisawa, H. und Takashina, N. J.Soc.Japan 1926 ref. von Margot und Reichstein, Pharm.Acta Helv. 17,113,1942

Für die Überlassung einer Literatursammlung (Photokopien), die ich für die Bearbeitung einzelner Teile dieser Arbeit gut verwenden konnte, möchte ich Herrn Apotheker Jürgen Zech, Hamburg, an dieser Stelle bestens danken.

L e b e n s l a u f

Als Sohn des Apothekers Dr. phil. Hans Klingmüller und seiner Ehefrau Sonny, geb. Dohrmann, wurde ich, L u d w i g K l i n g m ü l l e r, am 12. November 1932 in Bremen geboren. Nachdem ich vier Jahre die Vorschule besucht hatte, zog unsere Familie wegen der Kriegseinwirkungen auf das Land; ich besuchte dann die Hauptschule in Worpswede. Nach Kriegsende zogen wir wieder nach Bremen, und ich wurde in die Quinta des dortigen Alten Gymnasiums aufgenommen. Im Februar 1953 machte ich das Abitur. Nach zweijähriger Praktikantenzeit in der väterlichen Sonnen-Apotheke in Bremen und bestandener pharmazeutischer Vorprüfung begann ich im Mai 1955 mein Studium an der Universität Hamburg. Nach sechs Semestern, im Mai 1958, bestand ich die pharmazeutische Prüfung in Hamburg. Nach halbjähriger Kandidatenzeit wurde ich von Herrn Professor Dr.F.Neuwald, Bad Bramstedt/Holstein, mit der vorliegenden Promotionsarbeit betraut. Von Beginn des Sommersemesters 1959 an bin ich wieder an der Universität Hamburg immatrikuliert. Am 15. Mai 1959 wurde mir die Bestallung als Apotheker erteilt.

Hamburg, im Oktober 1960